
Die Rolle des NF- κ B Signalwegs in LMP1/CD40-exprimierenden B- Zellen in vivo

Kristina Stojanovic



München 2013

Die Rolle des NF- κ B Signalwegs in LMP1/CD40-exprimierenden B- Zellen in vivo

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Kristina Stojanovic
München, den 25.07.2013

ANGEFERTIGT AM HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN
DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND UMWELT

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der Einreichung: 25.07.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2013

Für meine Familie

„Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung“

(Charles Darwin)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	B-Lymphozyten.....	1
1.2	Die T-Zell-abhängige Immunantwort.....	3
1.3	Der CD40-Rezeptor	7
1.4	Der CD40-Signalweg	7
1.5	CD40 aktiviert den kanonischen und nicht kanonischen NF- κ B Signalweg.....	9
1.5.1	Struktur der NF- κ B Komponenten	9
1.5.2	Aktivierung des NF- κ B Signalwegs	11
1.5.2.1	Der kanonische NF- κ B Signalweg	11
1.5.2.2	Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg.....	13
1.6	NF- κ B Knockout-Mäuse	15
1.7	RelB- und IKK1-defiziente Mäuse	16
1.8	CD40 in der Tumorgenese	17
1.9	Der LMP1/CD40-transgene Mausstamm.....	17
2	Zielsetzung	19
3	Ergebnisse	20
3.1	Der Einfluss des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs auf die LMP1/CD40-induzierte B-Zellexpansion und -Aktivierung	20
3.1.1	Expression und Lokalisation der NF- κ B Komponenten nach Inaktivierung von IKK1 und RelB in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen	20
3.1.2	Die konstitutive Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs führt zu einem partiellen Block der B-Zell-Entwicklung und zu einer verminderten Anzahl von rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark	23
3.1.3	Die Deletion von IKK1 aber nicht von RelB führt zu erniedrigten Zellzahlen in der Milz der transgenen LMP1/CD40-Mäuse	27
3.1.4	Die B-Zell-Expansion in den RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40- und LMP1/CD40-Mäusen beginnt ab dem T2-B-Zell-Stadium.....	29
3.1.5	Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs beeinflusst den Phänotyp und die Lokalisation von MZ-B-Zellen in LMP1/CD40-Mäusen.....	31
3.1.6	Die Marginalzonen-B-Zellen siedeln sich in den LMP1/CD40-Mäusen nach Deletion von RelB oder IKK1 vermehrt in der Marginalzone an.....	34
3.1.7	Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs ist für die B-Zell-Akkumulation in den Lymphknoten der LMP1/CD40-Mäuse verant-wortlich.....	37

3.1.8	Die Reduktion der B1-Zellen in der Peritonealhöhle von transgenen LMP1/ CD40-Mäusen kann durch die Deletion von RelB und IKK1 aufgehoben werden	38
3.1.9	RelB ist für das verbesserte Überleben von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in vitro nicht notwendig	41
3.1.10	Die Deletion von RelB oder IKK1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in vitro	42
3.1.11	RelB- und IKK1-defiziente LMP1/CD40-B-Zellen können in vitro nach Stimulation zum IgG1-Isotyp wechseln	43
3.1.12	Die verstärkte Expression von CD95 und ICAM1 wird in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen teilweise über die Aktivität des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs reguliert.....	44
3.1.13	Die T-Zell-Expansion ist in den RelB- und IKK1-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen unverändert.....	45
3.1.14	Die Deletion von RelB in LMP1/CD40-B-Zellen führt zu einem erhöhten Prozentsatz an T-follikulären Helferzellen.....	46
3.2	Die Rolle des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs in LMP1/CD40-Mäusen bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort.....	51
3.2.1	Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs ist nicht für die Abwesenheit der Keimzentren in LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich	51
3.2.2	Die B-zellspezifische Deletion von RelB in LMP1/CD40-Mäusen führt zu einer verstärkten Bildung von IgM und niederaffinen NP-spezifischen IgG1-Antikörpern	53
3.2.3	Plasmazellbildung nach Immunisierung.....	55
3.3	Die Inaktivierung von RelB und IKK1 hat keinen Einfluss auf die Aktivität der MAPK Erk und Jnk.....	57
3.3.1	Die erhöhte Erk-Phosphorylierung wird in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen über Nemo vermittelt	58
3.3.2	Die Erk-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen erfolgt möglicherweise über Akt und Tpl2.....	59
4	Diskussion	62
4.1	Die Rolle des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen	62
4.1.1	Veränderte Prozessierung und Lokalisation der NF-κB Komponenten nach Inaktivierung von RelB oder IKK1 in LMP1/CD40-B-Zellen	62
4.1.2	Die konstitutive Aktivität des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs beeinflusst die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark.....	63

4.1.3	Der Einfluss des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs in der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Expansion.....	64
4.1.4	Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs hält die MZ-B-Zellen im Follikel zurück	67
4.1.5	Der Einfluss von RelB und IKK1 auf das Überleben und die Proliferation LMP1/CD40-exprimierender B-Zellen in vitro	68
4.1.6	In Abwesenheit von RelB führen LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen zur Bildung von T _{fh} -Zellen	69
4.2	Der nicht kanonische NF-κB Signalweg ist nicht für die Abwesenheit der Keimzentren in LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich	70
4.3	Nemo ist für die Erk-Phosphorylierung und B-Zell-Expansion in den LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich	72
5	Zusammenfassung.....	76
6	Material	78
6.1	Mausstämme.....	78
6.2	Enzyme und dNTP's.....	78
6.3	Inhibitoren	79
6.4	Primer	79
6.5	Antikörper	79
6.6	Verbrauchsmaterial	81
6.7	Software	81
6.8	Geräte.....	81
7	Methoden	83
7.1	Analyse von transgenen Mäusen	83
7.1.1	Maus-Verpaarungen	83
7.1.2	Präparation primärer Lymphozyten aus der Maus	83
7.1.3	Isolierung reifer B-Zellen aus der Milz	84
7.1.4	Immunisierung von Mäusen	84
7.1.5	Präparation vom Blutserum aus Mäuseblut.....	85
7.1.6	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	85
7.1.7	Bestimmung der NP-spezifischen Immunglobulintiter	85
7.1.8	Elispot.....	86
7.1.9	Immunhistochemie von Gefrierschnitten.....	87
7.1.10	Durchflusszytometrie (FACS).....	88
	Besondere Färbung mit CXCR5	88
7.1.11	Intrazelluläres FACS	89

7.2	Molekularbiologische Methoden.....	89
7.2.1	DNA präparative Techniken.....	89
7.2.1.1	DNA Isolation aus Mausschwanzspitzen.....	89
7.2.1.2	Techniken der DNA-Analyse.....	90
	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	90
	Programm.....	90
	Agarose Gelelektrophorese.....	91
7.2.2	Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	91
7.2.2.1	Präparation von Proteinen aus Zellen.....	91
7.2.2.2	Kernfraktionierung.....	91
7.2.2.3	Proteinquantifizierung und Probenvorbereitung.....	92
7.2.2.4	SDS-PAA-Gelelektrophorese.....	92
7.2.2.5	Western-Blotting.....	92
7.2.2.6	Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörpern.....	93
7.2.2.7	Wiederverwendung eines Western-Blots.....	94
7.3	Zellkultur.....	94
7.3.1	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	94
7.3.2	Bestimmung der Zelldichte.....	94
7.3.3	Kultivierung primärer Lymphozyten.....	95
7.3.4	In vitro Proliferationsassay.....	95
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	96
	Erklärung.....	107
	<i>DANKSAGUNG</i>	108

Abkürzungen

α	anti
AID	aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
BAFF	B cell-activating factor
Bcl-6	B-cell lymphoma 6
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaar (e)
BZR	B-Zell-Rezeptor (B cell receptor)
BSA	Rinder-Serum Albumin (bovine serum albumine)
C	C-Terminus
CCR	C-C chemokine receptor type
CD	cluster of differentiation
CFSE	Carboxy-Fluoreszein Diacetat Succinimidyl-Ester
CGG	chicken gamma globulin
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
Cre	Protein-Rekombinase vom Phagen P1 (Causes Recombination)
CSR	Class switch recombination (Klassenwechsel)
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
CXCR	CXC chemokine receptors
DMEM	Dulbecco's modification of the eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DZ	dendritische Zellen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Erk	extracellular signal-regulated kinase
et al.	und andere (et alii)
FACS	Fluoreszenz-assozierte Durchflusszytometrie
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FDZ	Follikuläre dendritische Zellen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fo-B	follikuläre B-Zelle
g	Gramm
x g	x-fache Erdbeschleunigung
GBZ	Gedächtnis-B-Zellen
h	Stunde
HEPES	4-2-hydroxyethyl 1-piperazine ethanesulfonic acid
HRP	Meerrettich Peroxidase

ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
ICOS	inducible T-cell costimulator
Ig	Immunglobulin
Ig α , β	Immunglobulin-assoziierte Signalmoleküle α und β
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
IL	Interleukin
iLN	inguinale Lymphknoten
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK	Janus-Kinase
Jnk	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Liter
LMP	latentes Membran-Protein
LPS	Lipopolysaccharide
loxP	locus of crossing over, x
M	Molar
MACS	Magnetic associated cell sorting
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mb	Megabasenpaare (1x10 ⁶ Bp)
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility
μ g	Mikrogramm
μ -Kette	schwere Kette des Immunglobulins
min	Minute
mL	Milliliter
μ L	Mikroliter
mM	Millimolar
MOMA	Monozyten, Makrophagen
mRNA	Boten RNA (messenger RNA)
MEK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase/ERK-Kinase
MZ-B	Marginalzonen-B-Zellen
N	N-Terminus / Amino-Terminus
NP-CGG	Hühner-Gammglobulin-konjugiertes Nitrophenylacetyl
NES	nuclear export sequence
NF- κ B	Kernfaktor- κ B (nuclear factor- κ B)
NLS	nuclear localization sequence
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (posphate buffered saline)
PC	Peritonealhöhle (peritoneal cavity)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PD-1	programmed cell death 1
PE	phycoerythrin

PerCP	Perdinin-Chlorophyll-Protein
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
Prä-BZR	Prä-B-Zell-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute; rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
s	Sekunde
SHM	Somatische Hypermutation
SLC	Surrogate light chain (Ersatz-Leichte Kette)
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
T B-Zelle	Transitionelle B-Zelle
TAB2/3	TAK-1 bindenden-Proteine 2 und 3
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	transforming growth factor β activated kinase 1
TD	T-Zell-abhängig; T cell dependent
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylene diamine
T _{fh} -Zelle	T-follikuläre Helfer-Zelle
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TI	T-Zell-unabhängig; T cell independent
TNF-R	Tumor-Nekrose Faktor-Rezeptor (TNF-R)
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
V	Volt
WB	Western-Blot
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
x	mal

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER B-ZELL-ENTWICKLUNG IM KNOCHENMARK	2
ABBILDUNG 2 IMMUNOLOGISCHE SYNAPSE.....	5
ABBILDUNG 3 DER CD40-SIGNALWEG	8
ABBILDUNG 5 VEREINFACHTE DARSTELLUNG DES KANONISCHEN NF- κ B SIGNALWEGS.....	12
ABBILDUNG 6 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES NICHT KANONISCHEN NF- κ B SIGNALWEGS.....	14
ABBILDUNG 8 DIE INAKTIVIERUNG VON RELB ODER IKK1 IN DEN LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN BEEINFLUSST DIE PROZESSIERUNG UND LOKALISATION VON RELB, p52 UND p50.....	22
ABBILDUNG 9 QUATIFIZIERUNG VON WESTERN-BLOT-FILMEN	23
ABBILDUNG 10 DIE INAKTIVIERUNG VON RELB ODER IKK1 IN LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN HEBT DIE B- ZELLZAHLEN IM KNOCHENMARK WIEDER AUF DAS KONTROLL-NIVEAU AN	24
ABBILDUNG 11 DER NICHT KANONISCHE NF- κ B SIGNALWEG IST FÜR DIE VERMINDETE ANZAHL VON PRO-, PRÄ-, UNREIFEN UND REZIRKULIERENDEN B-ZELLEN IM KNOCHENMARK DER LMP1/CD40-MÄUSE VERANTWORTLICH ..	25
ABBILDUNG 12 DIE IGD ⁺ -ZELLEN SIND IN DEN RELB//LMP1/CD40- UND IKK1//LMP1/CD40-MÄUSEN WIEDER AUF KONTROLL-NIVEAU ERHÖHT.	26
ABBILDUNG 13 DIE VERSTÄRKTE AKTIVITÄT DES NICHT KANONISCHEN NF- κ B SIGNALWEG HAT NUR EINEN BEGRENZTEN EINFLUSS AUF DIE B-ZELL-EXPANSION IN DEN LMP1/CD40-MÄUSEN	28
ABBILDUNG 14 ANTEIL DER TRANSITIONELLEN B-ZELLEN.....	29
ABBILDUNG 15 DIE INAKTIVIERUNG VON RELB UND IKK1 HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE ANZAHL TRANSITIONELLER B- ZELLEN IN DER MILZ VON LMP1/CD40-MÄUSEN.....	29
ABBILDUNG 16 DIE EXPANSION DER B-ZELLEN IN DEN LMP1/CD40-MÄUSEN BEGINNT UNABHÄNGIG VOM NICHT KANONISCHEN NF- κ B SIGNALWEG AB DEM T2-B-ZELLSTADIUM	30
ABBILDUNG 17 DIE DELETION VON IKK1 IN DEN LMP1/CD40-B-ZELLEN FÜHRT ZU EINER ERNIEDRIGUNG DER IGM ⁺ IGD ^{NIEDRIG} -POPULATION.....	32
ABBILDUNG 18 DIE INAKTIVIERUNG VON IKK1 FÜHRT ZU EINER ABNAHME DER MZ-B- ABER NICHT FO-B-ZELLEN IN DER MILZ.....	33
ABBILDUNG 19 NACH INAKTIVIERUNG VON RELB ODER IKK1 IN LMP1/CD40-B-ZELLEN SITZEN DIE MZ-B-ZELLEN VERMEHRT IN DER MARGINALZONE.....	35
ABBILDUNG 20 DER NICHT KANONISCHE NF- κ B SIGNALWEG UNTERDRÜCKT DIE CXCR4-EXPRESSION AUF DEN B-ZELLE 36	
ABBILDUNG 21 DER NICHT KANONISCHE NF- κ B SIGNALWEG SPIELT BEI DER B-ZELL-AKKUMULATION IN DEN LYMPHKNOTEN DER LMP1/CD40-MÄUSE EINE ROLLE	37
ABBILDUNG 22 NACH DELETION VON RELB ODER IKK1 IN DEN LMP1/CD40-B-ZELLEN GELANGEN WIEDER MEHR ZELLEN IN DIE PERITONEALHÖHLE.....	39
ABBILDUNG 23 DER KONSTITUTIV AKTIVE NICHT KANONISCHE NF- κ B SIGNALWEG IST FÜR DIE ERNIEDRIGTEN B1A- UND B1B-ZELLEN IN DEN LMP1/CD40-MÄUSEN VERANTWORTLICH.	40
ABBILDUNG 24 RELB IST FÜR DAS VERBESSERTE ÜBERLEBEN DER LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN NICHT NOTWENDIG.....	41
ABBILDUNG 25 DIE AKTIVITÄT DES NICHT KANONISCHEN NF- κ B SIGNALWEGS IST FÜR DIE LMP1/CD40-INDUZIERT PROLIFERATION DER B-ZELLEN NICHT VERANTWORTLICH.....	43
ABBILDUNG 26 RELB- UND IKK1-DEFIZIENTE LMP1/CD40-EXPRIMIERENDE B-ZELLEN KÖNNEN IN VITRO NACH STIMULATION ZUM IGG1-ISOTYP WECHSELN	44
ABBILDUNG 27 RELB UND IKK1 SPIELEN EINE ROLLE BEI DER EXPRESSION VON AKTIVIERUNGS-MARKERN IN LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN	45
ABBILDUNG 28 DER NICHT KANONISCHE NF- κ B SIGNALWEG SPIELT KEINE ROLLE FÜR DIE T-ZELL-EXPANSION IN LMP1/CD40-MÄUSEN.....	46
ABBILDUNG 29 DIE VERSTÄRKTE AKTIVITÄT DES NICHT KANONISCHEN NF- κ B SIGNALWEGS FÜHRT ZU EINER ERHÖHTEN ICOS-L-EXPRESSION IN LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN	47
ABBILDUNG 30 DIE EXPRESSION VON PD-L1 IN LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN IST ABHÄNGIG VON RELB UND IKK1.....	48
ABBILDUNG 31 DIE INAKTIVIERUNG VON RELB IN LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN HAT EINE ERHÖHUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS VON T _{FH} -ZELLEN ZUR FOLGE.....	49
ABBILDUNG 32 DIE VERMEHRT VORHANDENEN T _{FH} -ZELLEN IN DEN RELB/LMP1/CD40-MÄUSEN EXPRIMIEREN DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR BCL-6.....	50
ABBILDUNG 33 NACHWEIS VON KEIMZENTRUMS-B-ZELLEN.....	51
ABBILDUNG 34 NACHWEIS VON KEIMZENTREN DURCH IMMUNHISTOCHEMIE.	52
ABBILDUNG 35 DIE RELB-INAKTIVIERUNG IN LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN FÜHRT ZU EINER ERHÖHUNG DER IGM- UND NIEDERAFFINEN-IGG1-ANTIKÖRPERTITER IM SERUM	54
ABBILDUNG 36 RELB//LMP1/CD40-MÄUSE HABEN IM VERGLEICH ZU LMP1/CD40-MÄUSEN NACH T-ZELL-ABHÄNGI- GER IMMUNISIERUNG LEICHT VERMEHRT IGM- UND NIEDERAFFINE IGG1-SEZERNIERENDE PLASMAZELLEN	56

ABBILDUNG 37 DER NICHT KANONISCHE NF- κ B SIGNALWEG IST NICHT FÜR DIE BILDUNG DER GEDÄCHTNIS-B-ZELLEN WICHTIG	57
ABBILDUNG 38 DER NICHT KANONISCHE NF- κ B SIGNALWEG SPIELT KEINE ROLLE IN DER LMP1/CD40-INDUZIERTEN PHOSPHORYLIERUNG VON ERK	58
ABBILDUNG 39 NEMO SPIELT EINE ROLLE IN DER LMP1/CD40-INDUZIERTEN ERK-PHOSPHORYLIERUNG	59
ABBILDUNG 40 DIE AKTIVIERUNG VON ERK UND JNK IN LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN WIRD DURCH DIE BEHANDLUNG MIT EINEM TPL2-INHIBITOR REDUZIERT	60
ABBILDUNG 41 DIE p65-PHOSPHORYLIERUNG IN DEN LMP1/CD40-EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN IST NACH Msk1- INHIBIERUNG REDUZIERT	61
ABBILDUNG 43 ARBEITSMODELL FÜR DAS LMP1/CD40-SIGNAL IN B-ZELLEN	75

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 KNOCKOUT- UND TRANSGENE MÄUSE DER IKK- UND I κ B α -PROTEINE	15
TABELLE 2 NF- κ B-KNOCKOUT- UND -KNOCK-IN-MÄUSE	16
TABELLE 3 PROZENTUALER ANTEIL UND ZELLZAHLEN DER B-ZELL-POPULATIONEN IM KNOCHENMARK	27
TABELLE 4 PROZENTUALER ANTEIL UND ZELLZAHLEN DER TRANSITIONELLEN B-ZELLEN IN DER MILZ	31
TABELLE 5 PROZENTUALER ANTEIL UND ZELLZAHLEN DER B-ZELL-POPULATIONEN IN DER PERITONEALHÖHLE	40

1 Einleitung

1.1 B-Lymphozyten

Die Entwicklung der B-Zellen findet im Knochenmark statt. Die B-Zellen entwickeln sich aus pluripotenten Vorläuferzellen, den hämatopoetischen Stammzellen, die entweder zu myeloiden oder lymphatischen Vorläuferzellen (common myeloid progenitor, CMP; common lymphoid progenitor, CLP) differenzieren (Abbildung 1). Ziel der B-Zell-Entwicklung ist die Bildung von B-Zellen, die einen funktionellen und nicht selbstreaktiven B-Zell-Rezeptor (BZR) auf ihrer Oberfläche besitzen. Der BZR-Komplex besteht aus einer schweren Kette (IgH), einer leichten Kette (IgL) und zwei assoziierten Signalmolekülen $Ig\alpha$ (CD79a) und $Ig\beta$ (CD79b). In dem Pro-B-Zell-Stadium, dem frühesten Entwicklungsstadium von B-Zellen, kommt es zur Expression der Enzyme Rag1 und Rag2, die die Genumordnung des Ig (Immunglobulin) schwere Ketten- (IgH) Gen-Lokus katalysieren. Im ersten Rekombinationsschritt, der in den frühen Pro-B-Zellen erfolgt, wird ein D_H -(diversity) Segment an ein J_H -(joining) Segment der schweren Kette fusioniert. Am Übergang zur späten Pro-B-Zelle kommt es zur Umlagerung von V_H -(variable) Gensegmenten an die schon vorhandenen rekombinierten D_HJ_H - Gensegmente (Tonegawa, 1983). Das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) fügt zusätzliche Nukleotide an die DNS-Bruchstellen, die bei der Rekombination entstehen, ein und trägt somit zu einer größeren Vielfalt des B-Zell-Rezeptorrepertoires bei (Gilfillan et al., 1993). Ist die Umlagerung des IgH-Lokus beendet, wird die schwere Kette zunächst zusammen mit einer Ersatz-Leichten Kette (surrogate light chain, SLC), die aus V_{preB} und $\lambda 5$ besteht, auf der Oberfläche als Prä-B-Zell-Rezeptor (Prä-BZR) exprimiert (Melchers et al., 1993). Nur wenn die Prä-B-Zellen einen funktionalen Prä-BZR exprimieren, können die großen Prä-B-Zellen zu kleinen Prä-B-Zellen weiter differenzieren. In diesem Stadium erfolgt die Umlagerung der leichten Ketten der Immunglobuline (IgL), wobei zuerst $Ig\kappa$ umgelagert wird. Nur wenn es nach Rekombination im $Ig\kappa$ -Lokus zu keiner produktiven Umordnung gekommen ist, wird der $Ig\lambda$ -Lokus umgelagert. Nach erfolgreicher Umordnung der leichten Kette im Prä-B-Zell-Stadium kann der reife BZR, bestehend aus zusammengelagerten schweren und leichten Ketten auf der Oberfläche exprimiert werden. BZR-tragende B-Zellen werden als unreife B-Zellen bezeichnet und gelangen, wenn sie nicht selbstreaktiv sind, in die

Peripherie. Der Mechanismus der allelischen Exklusion bewirkt, dass sobald eine funktionelle schwere oder leichte Immunglobulin-Kette exprimiert wird keine weitere Umlagerung auf dem zweiten Allel erfolgt, was gewährleistet, dass jede B-Zelle nur einen BZR derselben Spezifität besitzt (Alt, 1984). Um Autoimmunität durch B-Zellen, die ein Selbstantigen erkennen, zu verhindern, werden diese entweder negativ selektioniert (Apoptose) oder sie durchlaufen den Prozess der Rezeptoreditierung, um deren Rezeptorspezifität zu verändern (Edry and Melamed, 2004).

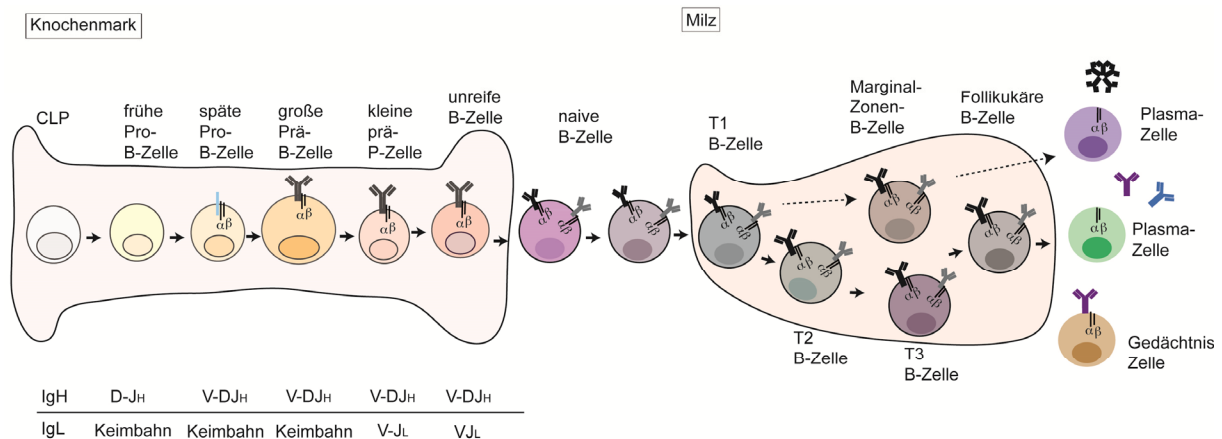


Abbildung 1 Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark (modifiziert nach (Benschop and Cambier, 1999)). Die lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitor, CLP) entwickeln sich im Knochenmark zu Pro-B-Zellen, danach zu den Prä-B-Zellen und anschließend zu den unreifen B-Zellen die über die Blutbahn in die Peripherie gelangen. In der Milz angelangt, reifen die transitionellen T1-Zellen über weitere Entwicklungsstadien (T2- und T3-Stadium) zu Marginalzonen- oder Follikulären-B-Zellen heran. Nach Antigenbindung können sie sich dann zu Plasma- oder Gedächtnis-Zellen weiterentwickeln.

Nur circa 10 % der B-Zellen überleben die negative Selektion im Knochenmark und gelangen als transitionelle B-Zellen (T1) über die Blutbahn in die Milz. Dort erfolgen dann weitere Differenzierungs- und Selektionsprozesse. Nur ein Drittel der T1-B-Zellen können zu T2- und T3-B-Zellen weiter differenzieren und sich dann zu reifen B-Zellen entwickeln (Chung et al., 2003). Transitionelle B-Zellen (T1, T2 und T3) sind relativ kurzlebig und stellen eine Übergangsform zwischen unreifen und reifen B-Zellen dar (Allman et al., 2001). Reife B-Zellen können im Körper lange Zeit überleben, indem sie Überlebenssignale von dem BAFF-Rezeptor (B cell activating factor receptor) oder vom tonischen B-Zell-Rezeptor-Signal erhalten (Forster et al., 1989; Kraus et al., 2004; Lam et al., 1997; Moore et al., 1999). In der Milz gibt es zwei Hauptpopulationen der reifen B-Zellen, die Follikulären- (Fo-) und Marginal-Zonen-B-Zellen (MZ-). Fo-B-Zellen wandern durch die Blutbahn in die sekundären lymphatischen Organe und können für ein paar Monate im Organismus überleben. Sie spielen in der adaptiven Immunantwort eine

wichtige Rolle. Die MZ-B-Zellen, die viel seltener als die Fo-B-Zellen vorhanden sind, findet man dagegen nur in der Milz. Sie befinden sich zusammen mit den metallophilen Makrophagen in der Marginalzone, die die Follikel umgibt. Auf diese Weise wird die rote Pulpa von der weißen getrennt. MZ-B-Zellen können in der roten Pulpa, welche stark durchblutet ist, Pathogene abfangen und haben dadurch eine essentielle Rolle in der humoralen Immunantwort. Nach Antigenkontakt differenzieren sie zu Plasmazellen und sezernieren niederaffine IgM- oder IgG1-Antikörper (Gray et al., 1996).

Eine weitere B-Zell-Population, die B1-Zellen, entstehen vermutlich aus den Stammzellen der fötalen Leber und bilden die vorherrschende B-Zellpopulation in pleuralen Auskleidungen und der Peritonealhöhle. MZ-B-Zellen und B1-Zellen stellen einen wichtigen Teil der angeborenen Immunität dar. MZ-B-Zellen und B1-Zellen haben nicht nur die Eigenschaft sich selbst zu erneuern, sie sind vermutlich auch die Hauptquelle von natürlichen IgM-Antikörpern (Martin and Kearney, 2001; Martin et al., 2001; Tarakhovsky, 1997).

1.2 Die T-Zell-abhängige Immunantwort

Die T-Zell-abhängige Immunantwort wird hauptsächlich von den Fo-B-Zellen durchgeführt (Rajewsky, 1996). Nach Bindung eines Antigens an den BZR wird das Antigen durch Endozytose von den B-Zellen internalisiert (1. Aktivierungssignal für die B-Zelle) (Abbildung 2). Nach dessen Prozessierung wird es zusammen mit dem MHC- (major histocompatibility complex) Klasse-II-Molekül auf der Oberfläche der B-Zellen den T-Zellen präsentiert. Bevor Antigen-spezifische CD4⁺-T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) über ihren TZR (T-Zell-Rezeptor) das Antigen auf den B-Zellen erkennen können, müssen diese jedoch auch aktiviert werden. Für die Aktivierung der naiven CD4⁺-T-Zellen präsentieren Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie die dendritischen Zellen, den T-Zellen über den MHC-II-Komplex das gleiche Antigen. Die MHC-II-TZR-Bindung zwischen B- und T-Zellen, welches das erste Signal für die T-Zell-Aktivierung darstellt, führt zur Induktion des CD40-Liganden auf der T-Zelle und somit zur Bindung an die B-Zelle über den CD40-Rezeptor (immunologische Synapse). Die CD40-CD40L-Interaktion stellt das zweite Signal für die B-Zelle dar. Danach werden Aktivierungsproteine wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf der B-Zelle exprimiert, die an CD28 auf der T-Zelle binden können, welches wiederum das zweite Aktivierungssignal für die T-Zelle ist. Dies führt zur Ausschüttung von Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und Lymphotoxin- α).

Außerdem wird auf den aktivierten T-Zellen der ICOS-Rezeptor (inducible T-cell costimulator) und auf B-Zellen der ICOS-Ligand induziert. Der ICOS-Rezeptor ist strukturell und funktionell mit dem CD28-Protein verwandt und scheint eine wichtige Rolle bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort zu spielen. ICOS- oder ICOS-L-defiziente Mäuse weisen eine gestörte Keimzentrumsbildung und geringere Serumkonzentration von IgG1 auf (Mak et al., 2003; Tafuri et al., 2001). Um die Immunantwort zu beenden und um eine Überaktivierung der T- und B-Zellen zu vermeiden, sind eine Reihe von negativ regulatorischen Molekülen bekannt (Saito et al., 1998). Das mit CD28 strukturell verwandte Oberflächenmolekül CTLA-4 bindet ebenfalls an CD80/CD86 (Brunet et al., 1987; Thompson and Allison, 1997) und beendet somit die CD28-induzierte Interleukin-Synthese (Krummel and Allison, 1996; Walunas et al., 1996; Walunas et al., 1994). Ein Molekül, das die Immunantwort negativ reguliert ist PD-1 (programmed cell death 1), welches ein Mitglied der Immunglobulin-Familie ist und auf CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killer-T-Zellen und Monozyten exprimiert wird (Keir et al., 2008; Parry et al., 2003). Der PD-Ligand 1 (PD-L1) ist in geringen Mengen konstitutiv auf B- und T-Zellen, dendritischen Zellen (DZ), Makrophagen und den mesenchymalen Stammzellen exprimiert (Yamazaki et al., 2002). Durch IFN α , β und γ wird PD-L1 auf den genannten Zellen hochreguliert, wohingegen der PD-L2 durch IL-4-Stimulation exprimiert wird. PDL-2 ist auf Gedächtnis-B-Zellen, DZ, Monozyten und auf mehr als 50% der B1-Zellen im Peritoneum exprimiert (Tomayko et al., 2008; Zhong et al., 2007). PD-1 inhibiert die T-Zell-Rezeptor-induzierte Phosphorylierung von ZAP70 und PI3K durch SHP-2 (SH2-domain containing tyrosine phosphatase 2) und verhindert damit die Signalweiterleitung. PD-1-defiziente Mäuse entwickeln spontane Autoimmunerkrankungen, wie Glomerulonephritis und Arthritis, Kardiomyopathie und Gastritis (Nishimura et al., 1998; Nishimura et al., 2001; Wang et al., 2010; Wang et al., 2005).

Durch die immunologische Synapse übertragenen Signale werden B-Zellen zur Proliferation aktiviert. Sie bilden nach klonaler Expansion entweder Keimzentren oder extrafollikuläre Foci. Keimzentren sind Strukturen in Follikeln von sekundären lymphatischen Geweben, wie der Milz, den Lymphknoten und den Peyerschen Plaques, die vier bis fünf Tage nach Antigenkontakt entstehen.

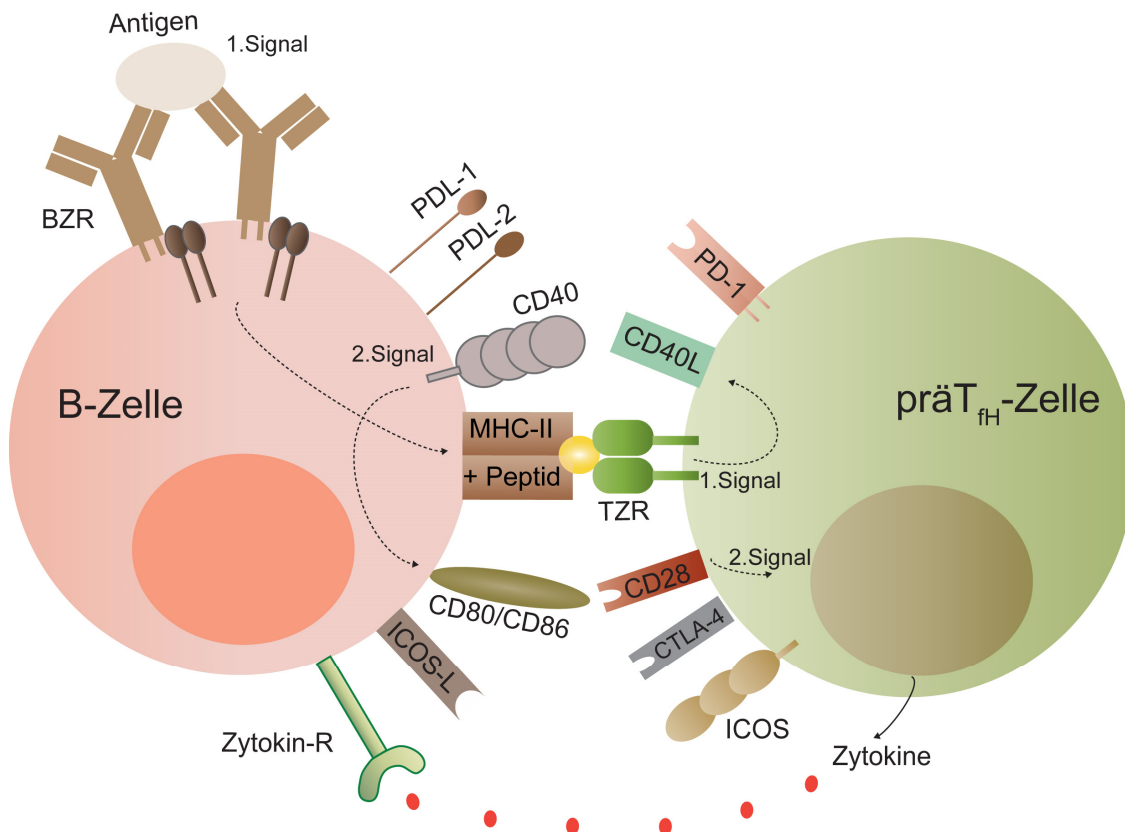


Abbildung 2 Immunologische Synapse. (modifiziert nach Janeway) Nach Antigenkontakt wird das Antigen den T-Zellen über den MHC-Komplex (major histocompatibility complex) Klasse II präsentiert. Die Bindung des T-Zell-Rezeptors mit dessen Korezeptor-CD3 an den MHC-Komplex Klasse II ist das erste Signal für die T-Zelle. Daraufhin exprimieren die CD4⁺ T-Zellen den CD40-Liganden, welcher an den CD40-Rezeptor auf den B-Zellen bindet. Anschließend kommt es zur CD80/CD86-CD28-Wechselwirkung, welche das Ko-Stimulierungssignal für die T-Zelle ist (zweites Signal). Dies führt zur T-Zell-Aktivierung und -Proliferation. Mit Hilfe der IL-4-Ausschüttung durch die aktivierten T-Zellen können die B-Zellen zum IgG1-Isotyp wechseln. CTLA-4 und PD-1 sind negative Regulatoren der T-Zell-Aktivierung. PD-L1 (programmed cell death ligand-1), PD1 (programmd cell death 1), ICOS (inducible T-cell costimulator), Zytokin-R (Zytokin-Rezeptor), BZR (B-Zell-Rezeptor), TZR (T-Zell-Rezeptor).

Sie entstehen aus bis zu zehn aktivierten B-Zellen, die sich mit einer Verdopplungszeit von sechs bis acht Stunden teilen. Die schnell proliferierenden B-Zellen werden als Zentroblasten bezeichnet. Diese bilden die dunkle Zone der Keimzentren. Keimzentrums-B-Zellen (KBZ) durchlaufen im Keimzentrum die somatische Hypermutation (somatic hypermutation, SHM), die zur Erhöhung der Antigen-Spezifität führt. Dabei werden die Gene der variablen Region der Ig-Gene mit einer Mutationsrate von 10^{-3} /Nukleotid verändert (Liu et al., 1997). Die sich dann zu Zentrozyten weiterentwickelnden B-Zellen durchlaufen in der hellen Zone des Keimzentrums die Immunglobulin-Klassenwechsel-Rekombination (class switch recombination, CSR). Beide Prozesse benötigen die Aktivität spezifischer Enzyme, wie die Aktivierungs-induzierte Cytidin-Desaminase (activation induced cytidine deaminase, AID) und

Enzyme, die bei der DNS-Reparatur beteiligt sind (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Die Affinität des BZR wird durch die Bindestärke des BZR mit einem auf follikulären dendritischen Zellen (FDZ) präsentierten Antigen getestet. Gleichzeitig erhalten die Zentrozyten mittels CD40-CD40L-Bindung Überlebenssignale von den T_H-Zellen (T-Helfer-Zellen). Niederaffine B-Zellen, die im Keimzentrum kein Überlebenssignal erhalten, können entweder durch somatische Hypermutation die Affinität des BZR erhöhen oder werden, wenn dies nicht gelingt, durch Apoptose eliminiert (Wolniak et al., 2004). T_H-Zellen sezernieren zusätzlich Zytokine, die einen Ig-Klassenwechsel einleiten. Hierbei wird die konstante Region μ durch eine andere konstante Region, wie γ , ϵ und α ersetzt, was zur Produktion von IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgE und IgA Antikörpern führt (Hasbold et al., 1998; Jabara et al., 1990). Dadurch entstehen verschiedene Ig-Isotypen, welche verschiedene Effektorfunktionen vermitteln und an unterschiedlichen Orten im Organismus ihre Funktion ausüben.

Der Selektionsprozess im Keimzentrum gewährleistet, dass nur B-Zellen mit einem hochaffinen B-Zell-Rezeptor das Keimzentrum verlassen können. Positiv selektionierte B-Zellen verlassen die Keimzentren entweder als langlebige, Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder als Gedächtnis-B-Zellen (GBZ) (McHeyzer-Williams and Ahmed, 1999). Plasmazellen sind nicht teilungsfähig und wandern in das Knochenmark, um dort Antikörper in die Blutbahn zu sezernieren, die einen lebenslangen Schutz vor spezifischen Pathogenen verleihen. Gedächtnis-B-Zellen verweilen in den sekundären lymphatischen Geweben in der Peripherie und führen bei erneutem Antigenkontakt zu einer schnellen und hochspezifischen sekundären Immunantwort.

Ein wichtige Subpopulation der CD4-positiven T_H-Zellen, die während der T-Zell-abhängigen Immunantwort eine wichtige Rolle spielt, sind die T-follikulären Helferzellen (T_{fh}-Zellen). Die T_{fh}-Zellen exprimieren neben CD4, ICOS und PD-1, den Chemokinrezeptor CXCR5 und den Transkriptionsmarker Bcl-6 (B cell lymphoma 6), welcher durch IL-21 induziert wird (Nurieva et al., 2009). Follikuläre dendritische Zellen (FDZ) im Keimzentrum exprimieren den Liganden für CXCR5, CXCL13, um die T_{fh}-Zellen zu rekrutieren. Gleichzeitig wird die CCR7-Expression auf den Prä-T_{fh}-Zellen herunterreguliert, damit diese Zellen die T-Zellzone verlassen und an die B-T-Zellzone wandern können (Haynes et al., 2007). Welche Faktoren genau die Entwicklung der T_{fh}-Zellen induzieren ist noch nicht ermittelt.

1.3 Der CD40-Rezeptor

CD40 ist ein 48 kDa großes Transmembran-Glykoprotein (Typ I) und gehört zur Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)-Rezeptor Superfamilie. Der CD40-Rezeptor wird nicht nur auf B-Zellen exprimiert, sondern auch auf dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen (Bourgeois et al., 2002; Dechanet et al., 1997; van Kooten and Banchereau, 1997). In vitro Studien haben gezeigt, dass CD40-stimulierte B-Zellen im Vergleich zu unstimulierten B-Zellen proliferieren und länger überleben sowie Aktivierungs- und Adhäsionsmarker wie CD23, CD95, CD80, CD86, MHCII und ICAM verstärkt exprimieren. Weiterhin sezernieren CD40-stimulierte B-Zellen Zytokine wie IL-6, IL-10, TNF α und TNF β (Dallman et al., 2003; Harnett, 2004). In Kombination mit IL-4 führt die CD40-Stimulation in B-Zellen zum IgG1-Klassenwechsel. In vivo spielen CD40-Signale eine wichtige Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Die Bindung von CD40 an dessen Liganden (CD40L), der auf aktivierten CD4⁺-T-Zellen exprimiert ist, führt in Kombination mit dem B-Zell-Rezeptor-Signal zur Aktivierung, Keimzentrumsbildung und Klassenwechsel. Es wurde gezeigt, dass CD40- oder CD40L-defiziente Mäuse nach T-Zell-abhängiger Immunisierung nicht fähig sind, antigenspezifische IgG1-Antikörper zu bilden oder Keimzentren auszubilden (Kawabe et al., 1994; Xu et al., 1994). Einen ähnlichen Immundefekt, „X-linked Hyper-IgM Syndrome“ genannt, beobachtet man in Patienten, die Mutationen in den Genen von CD40L oder CD40 tragen (Etzioni and Ochs, 2004).

1.4 Der CD40-Signalweg

Da der cytoplasmatische Anteil von CD40 keine intrinsische katalytische Aktivität besitzt, werden für die Signalweiterleitung in die Zelle sogenannte Tumor-Nekrosis-Rezeptor-Assoziierte Faktoren (TRAF) benötigt (Abbildung 3). Die Aktivierung des CD40-Rezeptors führt zur Rekrutierung von TRAF 1, 2, 3, 5 und 6 an die zytoplasmatische Domäne, wodurch jeweils unterschiedliche Signalwege aktiviert werden können, wie die Mitogen-Aktivierten Protein-Kinasen (MAPK): (I) Erk1 und Erk2, (II) Jnk1 und Jnk2 und (III) p38 sowie (IV) NF- κ B. Weiterhin werden PI3K über TRAF6, STAT3 und STAT6 über JAK3 (janus activated kinase) und Tyrosin-Kinasen, wie Lyn, Fyn und Syk über einen noch unbekannten Mechanismus aktiviert (Benson et al., 2006; Faris et al., 1994; Ren et al., 1994) (Abbildung 3).

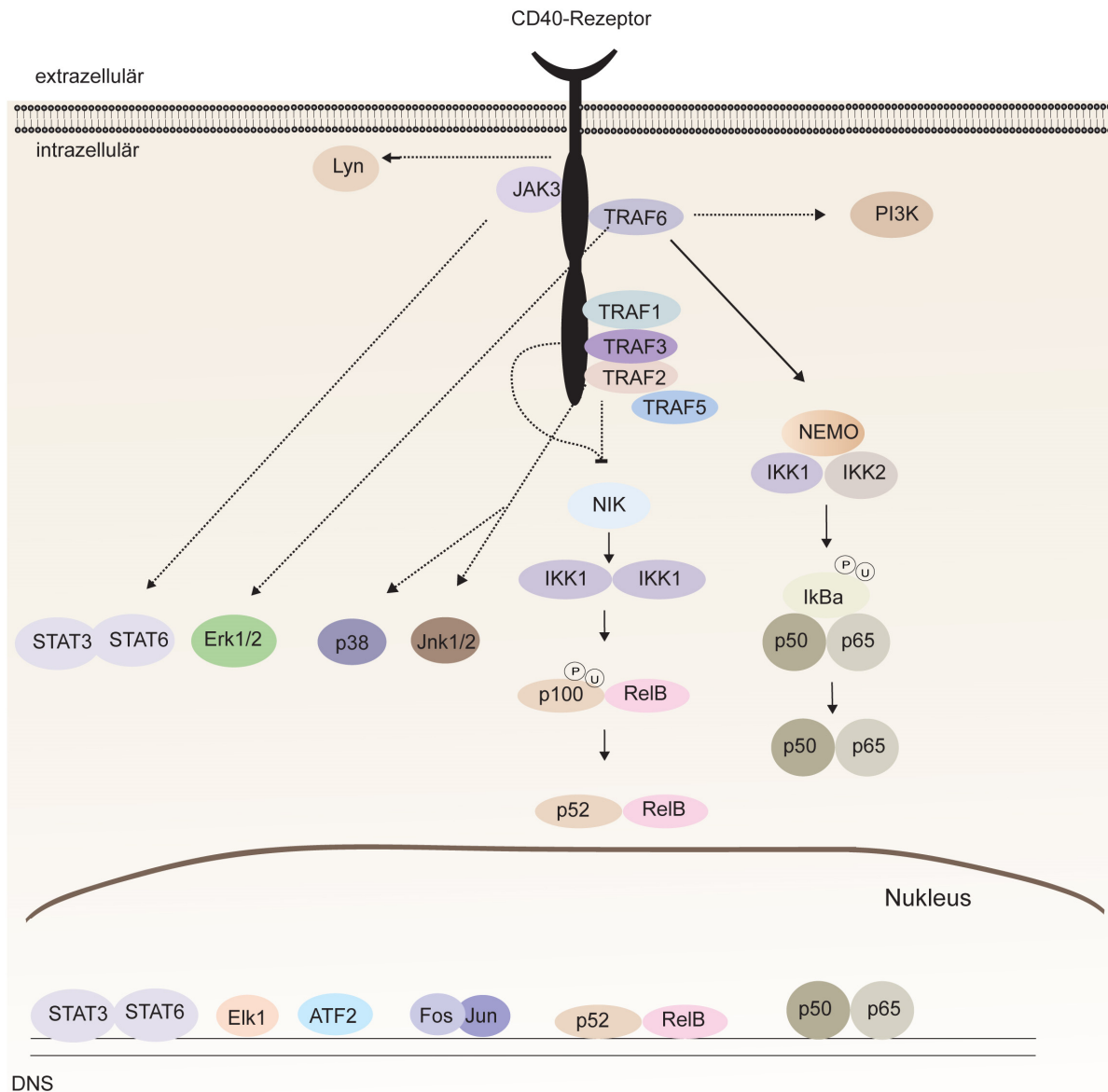


Abbildung 3 Der CD40-Signalweg (modifiziert nach (Harnett, 2004; van Kooten and Banchereau, 1997). Nach Liganden-Bindung und Trimerisierung des Rezeptors führt die Rekrutierung von JAK3, TRAF1, 2, 3, 5 und 6 zur Aktivierung der MAPK Erk, Jnk und p38, dem kanonischen (p50/p65, p65/c-Rel) und dem nicht kanonischen NF-κB Signalweg (p52/RelB), dem PI3K- sowie dem JAK-STAT-Signalweg. Erk, Jnk und p38 aktivieren Transkriptionsfaktoren, die an die DNS binden und die Transkription bestimmter Gene induzieren. Der kanonische und nicht kanonische NF-κB Signalweg werden über bestimmte Kinasen (NIK und IKKs) aktiviert, welche die NF-κB-Inhibitoren phosphorylieren. Diese werden dann mittels des Proteasoms 26S prozessiert und degradiert. P105 wird kontinuierlich zu p50 prozessiert. Anschließend können NF-κB Heterodimere in den Kern wandern und dort als Transkriptionsfaktoren fungieren. TRAF (TNF receptor associated factor), JAK (Janus kinase), NIK (nuclear κB inducing kinase), IKK (IκB kinase), IκBα (Inhibitor of κB α), Ub (Ubiquitin), P (phosphorylation), PI3K (Phosphoinositol 3 kinase), PLCγ2 (Phospholipase Cγ2), STAT (signal transducer and activator of transcription), Jnk (c-Jun N-terminal kinase), Erk (extracellular signal regulated kinase).

TRAF 1, 2 und 3 binden an sogenannte PxQxT-Motive, TRAF6 an QxPxEx-Bindestellen, während TRAF5 indirekt über TRAF3 oder TRAF2 an den CD40-Rezeptor bindet (Bishop et al., 2007; Pullen et al., 1999; Pullen et al., 1998). Bindet TRAF2 an CD40, so führt dies

zur Aktivierung des Jnk-, p38- und Akt-Signalwegs (Hostager et al., 2003; Lee et al., 1997). Weiterhin ist bekannt, dass TRAF2 bei der Rekrutierung von TRAF6 an CD40 involviert ist (Davies et al., 2005). TRAF6 initiiert die Aktivierung der Signalwege von Jnk-, p38-, Erk-, Akt- und den NF- κ B-Signalweg. Der durch CD40 aktivierte NF- κ B Signalweg besteht aus dem kanonischen und dem nicht kanonischen NF- κ B-Signalweg. Genauere Erläuterungen dieser Signalwege erfolgen im nächsten Abschnitt.

1.5 CD40 aktiviert den kanonischen und nicht kanonischen NF- κ B Signalweg

Die NF- κ B Komponenten wurden als Proteine identifiziert, die an den Enhancer der Immunglobulin-leichten Kette κ in B-Zellen binden (Sen and Baltimore, 1986). Heute ist bekannt, dass der NF- κ B Signalweg Gene reguliert, die die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen beeinflussen.

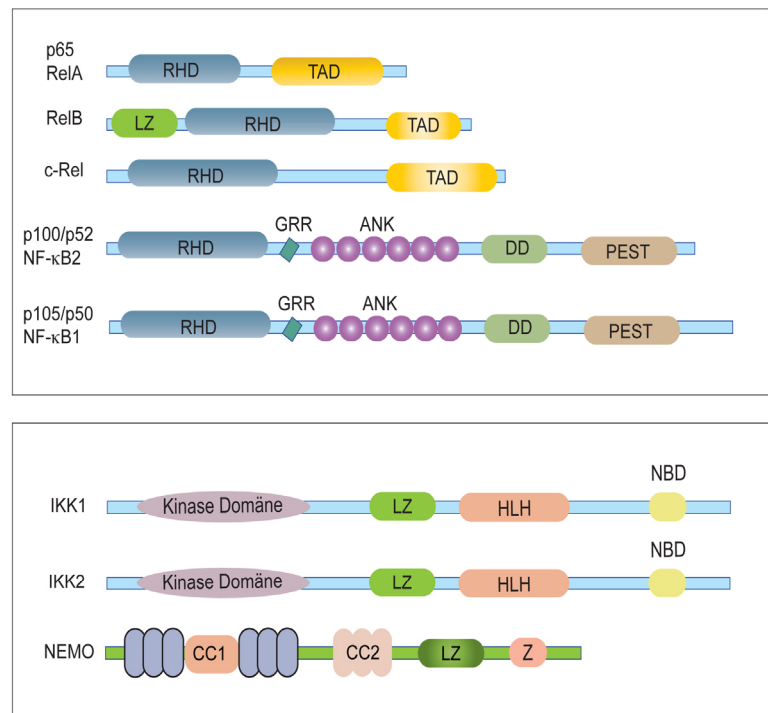
1.5.1 Struktur der NF- κ B Komponenten

In Säugerzellen besteht die NF- κ B- (nuclear factor- κ B) Genfamilie aus fünf Mitgliedern, welche für NF- κ B1 (p50 und dessen Vorläufer p105), NF- κ B2 (p52 und dessen Vorläufer p100), RelA (p65), c-Rel und RelB kodieren. Alle Komponenten enthalten eine Rel-Homologie-Domäne (rel homology domain, RHD), welche ein nukleäres Lokalisations-Signal (nuclear localization signal, NLS) und eine Sequenz für die Dimer-Formation beinhaltet (Abbildung 4). Nur p65, c-Rel und RelB haben an ihrem C-Terminus eine Transaktivierungs-Domäne (TAD), die wichtig für die Transkription der Zielgene ist. P100 und p105 besitzen eine sogenannte Glycin-reiche Region (GRR), die in p105 essentiell für die konstitutive Prozessierung von p105 zu p50 ist (Lin and Ghosh, 1996). Die PEST-Domäne von p100 und p105 enthält Serin-Reste, die von IKK1 oder dem IKK-Komplex, bestehend aus IKK1, IKK2 und Nemo (NF- κ B essential modulator) phosphoryliert werden (Ser866, Ser870 in p100 und Ser927, Ser932 in p105). Nach der Prozessierung enthalten die p52- und p50-Proteine noch die RHD-Domäne, wodurch sie mit anderen NF- κ B-Komponenten Dimere bilden können. Es können sowohl Homo- als auch Heterodimere gebildet werden. RelB bindet in erster Linie mit p100 oder dessen prozessierter Form p52 (Dobrzanski et al., 1995; Senftleben et al., 2001; Yilmaz et al., 2003) wohingegen p65 und c-Rel an p105 oder die prozessierte Form p50 binden (Karin and Ben-Neriah, 2000). Die Dimere binden als Transkriptionsfaktoren an 9-12

Basenpaar-lange DNS-Abschnitte, den sogenannten κ B-Bindestellen, deren Konsensus Sequenz (5'-GGGRNWYYCC-3') eine hohe Variabilität aufweist (Vallabhapurapu and Karin, 2009). Obwohl p52 und p50 keine TAD enthalten, können sie die Transkription positiv beeinflussen, indem sie an Proteine binden, die eine besitzen, wie RelB, c-Rel und p65. Andererseits können p52 oder p50 als Homodimere die Transkription negativ regulieren, indem sie die κ B-Bindestellen blockieren und dadurch andere Heterodimere nicht mehr binden können.

Abbildung 4 Aufbau der NF- κ B Proteine

(modifiziert nach (Oeckinghaus and Ghosh, 2009)). Gezeigt sind die Mitglieder der NF- κ B- und IKK-Protein-Familie. Die Rel-homologe Domäne (RHD) ist charakteristisch für die NF- κ B-Proteine. Die Vorläufer p100 und p105 enthalten Ankyrin Repeats (ANK), wodurch sie die NF- κ B-Proteine im Zytoplasma zurückhalten können. CC (coiled-coil), DD (death domain), GRR (glycine-rich region), HLH h(elix-loop-helix), IKK (I κ B kinase) LZ (leucine-zipper), NBD (NEMO binding domain) PEST (proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich region) TAD (transactivation domain), ZF (zinc finger).



In ruhenden Zellen wird die Translokation der Homo- (z.B. p50/p50, p52/p52) und Heterodimere (z.B. p52/RelB, p50/p65, p50/c-Rel) der verschiedenen NF- κ B-Komponenten durch die Bindung von inhibitorischen Molekülen, sogenannten I κ Bs (I κ B α , β und ϵ), an „Ankyrin-Repeats“ in den Zellkern verhindert. Die I κ Bs verdecken durch die Bindung die NLS der NF- κ B-Proteine und halten sie dadurch im Zytoplasma zurück (Ghosh and Hayden, 2008). Die Vorläufer von p50 (NF- κ B1) und p52 (NF- κ B2) enthalten ebenfalls „Ankyrin-Repeats“ und können daher auch als Inhibitoren fungieren (Dobrzanski et al., 1995; Liou et al., 1992). P100 (I κ B δ) bindet hauptsächlich an RelB und hält es im Zytoplasma zurück (Solan et al., 2002). P105 (I κ B γ) ist mit p50, c-Rel und p65 assoziiert und inhibiert so ebenfalls deren Wanderung in den Zellkern (Liou et al., 1992; Mercurio et al., 1993).

1.5.2 Aktivierung des NF- κ B Signalwegs

1.5.2.1 Der kanonische NF- κ B Signalweg

Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B Signalwegs in B-Zellen erfolgt unter anderem durch die CD40-Aktivierung. Nach CD40-CD40L-Bindung wird TRAF6 rekrutiert (Abbildung 5). TRAF6 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die sich selbst ubiquitinieren (K63-verknüpfte Ubiquitinketten) kann (Chen et al., 2006; Lamothe et al., 2007). Die Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Modifikation und spielt in der Aktivierung des NF- κ B Signalwegs eine essentielle Rolle. Man unterscheidet verschiedene Ubiquitinketten: (I) Die K48-verknüpfte Ubiquitinketten stellen ein Signal für die proteasomale Degradation dar. (II) K63-verknüpfte Ubiquitinketten beeinflussen die Signaltransduktion, indem sie eine Bindestelle für Proteine bieten, die eine Ubiquitin-Binde-Domäne enthalten. Es sind viele verschiedene Ubiquitin-bindende Adaptoren (UBA) bekannt. Die am besten charakterisierten UBAs sind die TAK-1 bindenden-Proteine 2 und 3 (TAB2 und TAB3) und die IKK1 regulatorische Untereinheit Nemo (NF- κ B-Essential-Modulator/IKK γ).

TRAF6 rekrutiert den TAB2/3-TAK1-Komplex an die K63-gekoppelte Polyubiquitinkette (Kanayama et al., 2004). Der TAB/TAK1/TRAF6-Komplex führt zur Rekrutierung des IKK-Komplexes. Der IKK-Komplex besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK1 (IKK α) und IKK2 (IKK β) sowie der regulatorischen Untereinheit Nemo (Karin and Ben-Neriah, 2000). Nemo kann mittels seiner Ubiquitin-Binde-Domäne an die Polyubiquitinkette von TRAF6 bindet. Anschließend initiiert TAK1 (transforming growth factor β activated kinase 1) die Phosphorylierung von IKK2 (Wang et al., 2001). Die Aktivierung des IKK-Komplexes führt zur Phosphorylierung von I κ B α an Ser32 und Ser36, was zur Verknüpfung von K48-Ubiquitinketten führt. Daraufhin erfolgt die Ubiquitin-abhängige Proteolyse von I κ B α durch das 26S Proteasom (Ghosh and Karin, 2002). Die Degeneration von I κ B α führt dazu, dass die Homo- oder Heterodimere (z.B. p50/p65, p50/c-Rel, p50/p50) in den Kern wandern können, um dort als Transkriptionsfaktoren zu agieren oder die Transkription bestimmter Gene zu inhibieren. Neu synthetisiertes I κ B α kann im Kern an z.B. p65/p50-, c-Rel/p50-, c-Rel/p65-Dimere binden und sie mittels ihres NES (nuclear export signal) in das Zytoplasma zurückbefördern (Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Chen et al., 2001). Die stärkste I κ B-Kinaseaktivität (IKK-Komplex-Aktivität) hat IKK2. Eine IKK1-Defizienz führt nur zu einer marginalen Erniedrigung der IKK-Aktivität (Hu et al., 1999),

wohingegen bei Abwesenheit von IKK2 nur noch wenig IKK-Kinase-Aktivität vorhanden ist (Li et al., 1999).

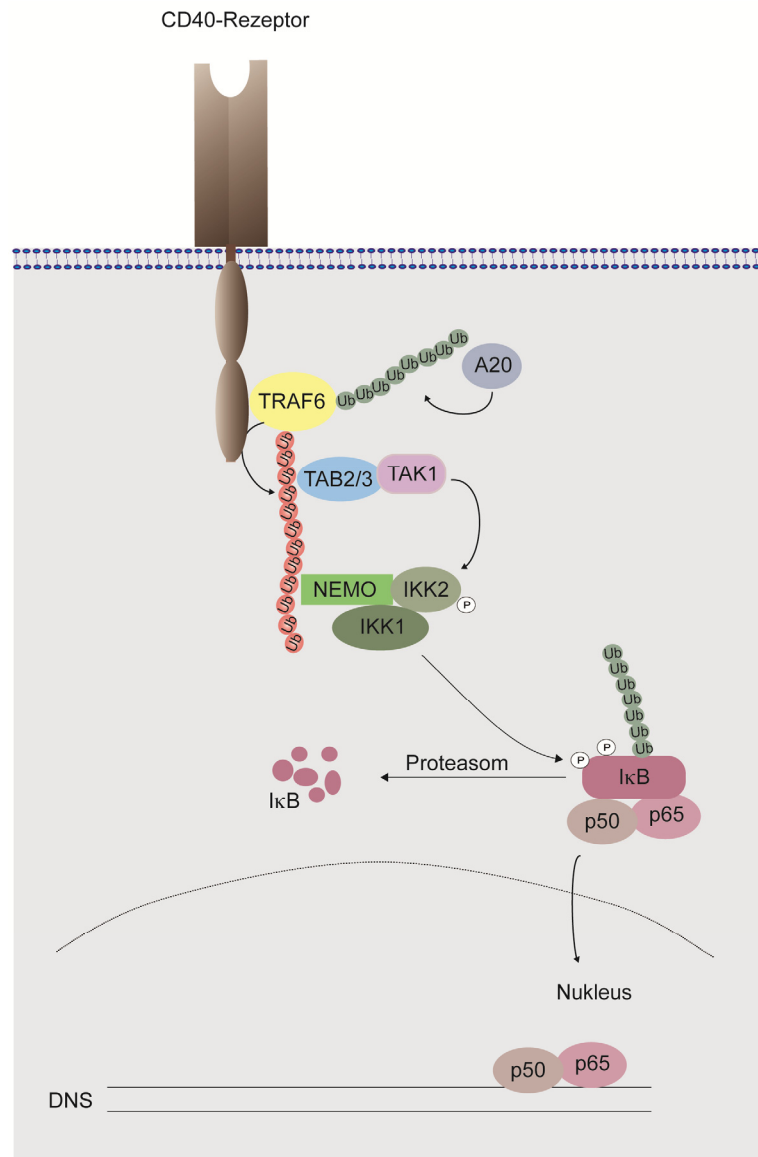


Abbildung 5 Vereinfachte Darstellung des kanonischen NF-κB Signalwegs. Der kanonische NF-κB Signalweg wird unter anderem über den TRAF6:TAB:TAK1-Komplex aktiviert. NEMO kann mit seiner Ubiquitin-Binde-Domäne an die Ubiquitinkette von TRAF6 binden. TAK1 phosphoryliert daraufhin IKK2. Dies führt zur Phosphorylierung und Ubiquitinierung von IκBα, welches anschließend proteasomal degradiert wird. Die durch IκBα im Zytoplasma zurückgehaltenen Heterodimer (p65/ p50) können dann in den Kern wandern und dort als Transkriptionsfaktoren fungieren. A20 ist ein negativer Regulator des NF-κB Signalwegs. Die K48-verknüpften Ubiquitinketten sind in grün dargestellt und die K63-verknüpften Ubiquitinketten in rot. TRAF6 (tumor necrosis factor receptor associated factor6), TAB (TAK-1 bindenden-Proteine), TAK (transforming growth factor β activated kinase 1), NEMO (NF-κB essential modulator).

P105, welches auch ein Inhibitor ist, kann entweder durch ko- oder posttranslationale Prozesse zu p50 mittels des Proteasoms prozessiert werden, indem der C-Terminus

entfernt wird und p50 entsteht (Lin et al., 1998; Moorthy et al., 2006) oder es wird nach Stimulation komplett degradiert.

A20 ist ein negativer Regulator des NF- κ B Signalwegs. Es kann sowohl K63-gekoppelte Polyubiquitinketten entfernen und mittels seiner E3-Ligase-Aktivität K48-gekoppelte Polyubiquitinketten an die zu degradierenden Proteine anbringen (Bosanac et al., 2010).

1.5.2.2 Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg

Die Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs erfolgt über die NF- κ B-induzierte-Kinase (NIK) (Abbildung 6). Im ruhenden Zustand kann TRAF3 den nicht kanonischen NF- κ B Signalweg inhibieren (He et al., 2007), indem TRAF3 einen Komplex mit TRAF2, dem cIAP1/2 (inhibitor of apoptosis 1 and 2) und NIK im Zytoplasma bildet. NIK wird von cIAP1 und 2 polyubiquitiniert (K48-Ubiquitinketten) und dadurch im 26S Proteasom degradiert. Nach Aktivierung vom CD40-Rezeptor wird TRAF2 an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors rekrutiert. TRAF2 führt zur K63-Ubiquitynylierung von cIAP1/2, wodurch dessen K48-spezifische E3-Ligase-Aktivität an TRAF3 verstärkt wird. Daraufhin wird TRAF3 mit einer K48-Polyubiquitinkette verknüpft und proteasomal degradiert. Dadurch wird NIK frei und aktiviert durch Phosphorylierung IKK1-Homodimere. Die IKK1-Homodimere phosphorylieren wiederum p100-Proteine an spezifischen Serinresten (Ser866 und Ser870). An die phosphorylierten Stellen kann SCF ^{β TrCP} (β -transducin repeat containing protein) binden und durch Assemblierung von K48-verknüpften Ubiquitinketten die proteasomale Degradation oder Prozessierung von p100 zu p52 induzieren (Fong and Sun, 2002). Daraufhin wandern die Heterodimere p52/RelB in den Kern und leiten die Transkription ihrer Zielgene ein (Xiao et al., 2001). Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg verläuft unabhängig von IKK2 oder Nemo.

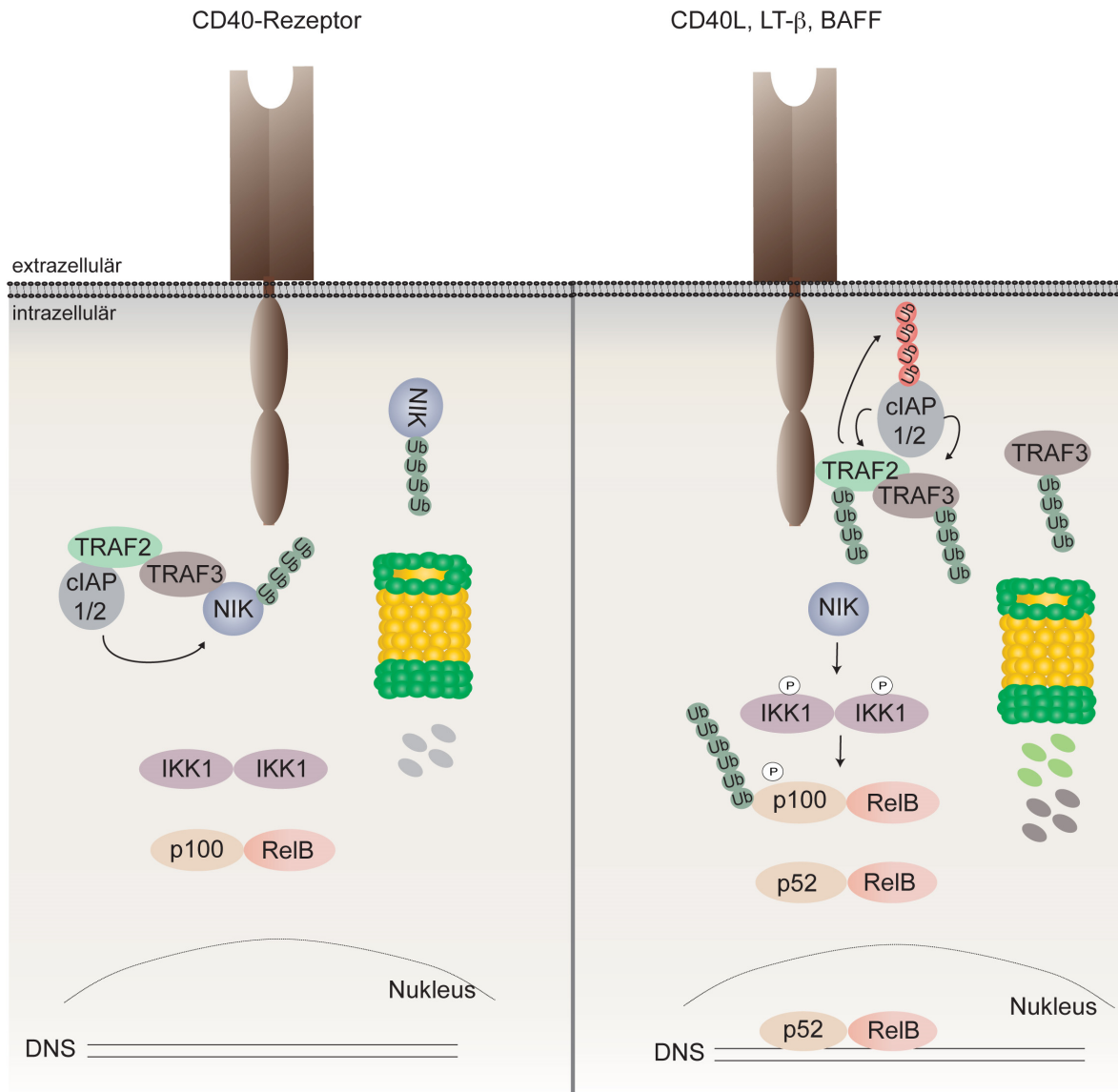


Abbildung 6 Schematische Darstellung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs (modifiziert nach (Vallabhapurapu and Karin, 2009)). In unstimulierten Zellen (linkes Bild) ist p100 über seine Ankyrin Repeats am C-Terminus an RelB gebunden und hält es im Zytoplasma zurück. TRAF3 rekrutiert NIK an einen E3-Ligase enthaltenden Komplex, bestehend aus TRAF2 und cIAP1/2. Letzteres vermittelt eine K48-verknüpfte Polyubiquitinierung von NIK, was zu dessen proteasomaler Degradation führt. Die Aktivierung von CD40 durch dessen Ligand (rechtes Bild) rekrutiert den cIAP1/2:TRAF2:TRAF3-Komplex an den Rezeptor. TRAF2 induziert eine K63-Polyubiquitinylierung an cIAP1/2, wodurch dessen K48-spezifische E3-Ligase-Aktivität gegen TRAF3 verstärkt wird. Daraufhin wird TRAF3 proteasomal degradiert und NIK wird dadurch freigesetzt. NIK phosphoryliert die IKK1-Homodimere, die wiederum p100 phosphorylieren. Dies führt zur Prozessierung von p100 zu p52. Die Heterodimere p52/RelB gelangen in den Kern und können dort die Transkription der Zielgene regulieren. Die K48-verknüpften Ubiquitinketten sind in grün und die K63-verknüpften Ubiquitinketten in rot dargestellt. NIK (NF- κ B inducing Kinase), TRAF (TNF receptor associated factor), cIAP1/2 (cellular inhibitors of apoptosis), IKK1 (I κ B Kinase 1).

1.6 NF-κB Knockout-Mäuse

Mit Hilfe verschiedener NF-κB Knockout- oder Knockin-Mäuse konnte der NF-κB Signalweg zum größten Teil aufgeklärt werden. Die NF-κB Komponenten haben in den verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Funktionen. In Tabelle 1 sind die Phänotypen der Knockout-Mäuse der IKK-Proteine aufgelistet und in Tabelle 2 die der NF-κB-Proteine. Durch die Deletion der NF-κB-Proteine konnten Zielgene der NF-κB Transkriptionsfaktoren entdeckt werden und heute ist bekannt, dass es viele NF-κB-regulierte Gene gibt: (I) Zytokine und Wachstumsfaktoren (TNFα, LTα, IL-2, -3, -6, -8, -12, IFNγ, p53 und Ras), (II) Transkriptionsfaktoren (c-myb, c-myc, p100, p105, junB), (III) immunregulierende Moleküle und Rezeptoren (IκBα, MHC-I, β2-Mikrotubulin, Igκ und Igλ), (VI) Leukozyten-Adhäsions-Moleküle (VCAM1, ICAM1, E-Selektin) und (V) Apoptose-Regulatoren (Bcl-xL, IAPs, Fas-Ligand).

Tabelle 1 Knockout- und transgene Mäuse der IKK- und IκBα-Proteine.

Genotyp	Letalität/Zelltyp	Defekte	Referenzen
Knockouts			
<i>ikkα</i> ^{-/-}	Tod bei Geburt	skelettartige- und epidermale- Defekte Reduzierte Anzahl der reifen B-Zellen	Hu et al. (1999), Li et al. (1999a), Takeda et al. (1999) Kaisho et al. (2001), Pasparakis et al. (2002)
<i>ikkβ</i> ^{-/-} <i>nemo</i> ^{-/-}	Ja (E13) Sterben an E10-11	keine B- und T-Zell-Entwicklung in bestrahlten Chimären; Entwicklung IgM ⁺ B-Zellen in einem in vitro Differenzierungs-Assay; Diese B-Zellen zeigen verstärkt Apoptose.	Li et al. (1999b) Kim et al. (2003)
Konditionale knockouts			
<i>Ikkβ</i>	B-Zellen T-Zellen	Reduktion der FoB- und MZ-B-Zellen Fehlen von NKT und CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen	Pasparakis et al. (2002) Schmidt-Supprian et al. (2004)
<i>Nemo</i>	T-Zellen B-Zellen	Reduktion der CD8 ⁺ , aber nicht der CD4 ⁺ T-Zellen; Reduktion der rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark, den Lymphknoten, und der B1- und B2-Zellen im Peritoneum Starke Reduktion der transitionellen B-Zellen, FoB- und MZB-Zellen	Schmidt-Supprian et al. (2003) Pasparakis et al. (2002)
IκBα ^{fl}	B-Zellen	Reduzierte MZB-Zellen, Notch2-Signalweg reduziert. FoB-Zellzahlen normal	Ellinghaus et al. (2008)

Tabelle 2 NF- κ B-Knockout- und -Knock-in-Mäuse.

Genotyp	Letalität/Zelltyp	Defekte	Referenzen
Knockouts			
<i>nfk1^{-/-}</i>	Nein	B-Zellen: MZB- und CD5 ⁺ peritoneale B-Zellen reduziert; fehlerhafter Klassenwechsel und beeinträchtigte humorale Immunantwort; gestörte Th2-Differenzierung	Sha et al. (1995), Grumont et al. (1998), Snapper et al. (1996), Cariappa et al. (2000), Pohl et al. (2002), Das et al. (2001), Artis et al. (2005)
<i>nfk2^{-/-}</i>	Nein	gestörte Entwicklung der sekundären lymphoiden Organe, verschlechterte B-Zell-Entwicklung und verbesserte DC-Funktion	Caamano et al. (1998), Franzoso et al. (1998), Speirs et al. (2004)
<i>p65^{-/-}</i>	Ja (E15)	Verschlechterte Entwicklung der sekundären lymphoiden Organe; keine Lymphknoten und peyersche Plaques Defekte in der Leukocyten-Rekrutierung, T-Zell-Antwort, Klassenwechsel zu IgG3	Alcamo et al. (2002) Alcamo et al. (2001,2002), Horwitz et al. (1999)
<i>relb^{-/-}</i>	Nein	Struktur-Defekte in sekundären lymphoiden Organen und Keimzentren-Bildung Fehlen von Payerschen Plaques; Keine Keimzentrenbildung und Fehlen von follikulären dendritischen Zellen; Verschiedene Organe: Entzündungen, Infiltration von Zellen die an Entzündungsreaktion beteiligt sind T-Zellen: verminderte Proliferation und Überleben von Einzel-positiven T-Zellen; verschlechterte Th1-Differenzierung Splenomegaly, vergrößerte Lymphknoten. Erhöhte B-Zellzahlen	Weih et al. (2001), Yilmaz et al. (2003) Burkly et al. (1995), Weih et al. (1995) Guerin et al. (2002), Corn et al. (2005), Weih et al. (1997) Ishikawa et al. (1998)
<i>nfk1ΔCT/ΔCT</i>	Nein		
Doppelt Knockouts			
<i>nfk1^{-/-}, nfkb2^{-/-}</i>	Nein	Mangel an MZB- und FoB-Zellen	Franzoso et al. (1997)
<i>nfk1^{-/-} crel^{-/-}</i>	Nein	stärkere Defekte als in den Einzel-Knockouts.	Pohl et al. (2002)

1.7 RelB- und IKK1-defiziente Mäuse

Der Einfluss des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs in den unterschiedlichsten Geweben konnte anhand von RelB- und IKK1-defizienten Mäusen gewonnen werden. Riemann und seine Kollegen haben konditionale RelB-Knockout-Mäuse hergestellt, indem sie Exon 4 des *RelB*-Gens mit loxP-Stellen flankiert (RelA-homologe Domäne) haben. In Anwesenheit der Cre-Rekombinase kommt es zur Exzision von Exon 4, die zu einer Leserasterverschiebung führt und somit zum Verlust des RelB-Proteins, da dieses nicht mehr exprimiert wird (Marc Riemann et al., Manuskript in Vorbereitung). Die RelB-Komplett-Knockout-Mäuse wiesen strukturelle Defekte in den sekundären lymphoiden Organen auf und waren unfähig Keimzentren auszubilden. Weiterhin infiltrierten Zellen, die bei der Entzündungsreaktion beteiligt sind in verschiedene Organe (Burkly et al., 1995; Weih et al., 2001; Weih et al., 1995). Die Deletion von RelB führt dazu, dass p52 mit anderen NF- κ B-Komponenten Dimere bildet.

Ralph Gareus und seine Kollegen generierten IKK1-defiziente Mäuse, indem sie Exon 6 bis 8 des *IKK1*-Gens mit loxP-Stellen flankiert haben (Gareus et al., 2007). Durch die Cre-Rekombinase wird der Bereich von Exon 6 bis 8 deletiert und das IKK1-Protein wird nicht mehr exprimiert, da es durch die Exzision zur Leserasterverschiebung kommt.

IKK1-Komplett-Knockout-Mäuse sterben kurz nach der Geburt und weisen Missbildungen bei der Entwicklung von Gliedern, Ohren, Kopf und der Schnauze auf (Hu et al., 1999; Li et al., 1999). Weiterhin scheint IKK1 bei der Entwicklung der Knochen eine Rolle zu spielen (Gareus et al., 2007). In Mäusen die ein nicht funktionelles IKK1-Protein exprimieren und somit keine IKK1-Kinase-Funktion mehr besitzen, ist die Prozessierung von p100 negativ beeinflusst und es entstehen nur geringe Mengen an RelB-p52-Dimeren (Balkhi et al., 2012).

1.8 CD40 in der Tumorgenese

CD40 ist unter anderem auch auf Tumorzellen exprimiert. Die Expression von CD40 wurde in Hodgkin Lymphomen und non-Hodgkin Lymphomen, chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) (Kato et al., 1998), multiplen Myeloma (Pellat-Deceunynck et al., 1996; Teoh et al., 2000) und akuter myeloider Leukämie (AML) (Aldinucci et al., 2002) beobachtet und man geht davon aus, dass CD40 bei der Pathogenese der Tumoren beteiligt ist. Zusätzlich konnte ein hohes Level an CD40-Expression in Karzinomen, wie Nasopharynx-, Zervix- oder den Ovarial-Karzinomen, festgestellt werden (Agathangelou et al., 1995; Altenburg et al., 1999; Gallagher et al., 2002). Interessanterweise sind einige dieser Tumoren mit dem Epstein Barr Virus (EBV) infiziert. EB-Viren exprimieren das „latent membrane protein“ (LMP1), welches eine funktionelle Homologie zu dem CD40-Rezeptor besitzt. Die Signalweiterleitung von LMP1 erfolgt, im Gegensatz zu CD40, ligandenunabhängig (Gires et al., 1997). Die konstitutive Aktivität wird durch die Transmembran-Domäne von LMP1 vermittelt. Diese besteht aus sechs hydrophoben Membrandurchgängen und führt zu einer permanenten Aggregation von LMP1-Molekülen. Die Expression von LMP1, wie auch die Aktivierung von CD40, führt zur Proliferation der B-Zellen und rettet sie damit vor der Apoptose (Zimmer-Strobl et al., 1996). Mäuse die B-zellspezifisch das LMP1-Protein exprimieren bilden nach circa 12 Monaten B-Zell-Lymphome aus (Kulwichit et al., 1998). Dies führte auch zu der Annahme, dass ein konstitutives CD40-Signal an einer Tumorentstehung beteiligt sein könnte.

1.9 Der LMP1/CD40-transgene Mausstamm

Um zu untersuchen, ob konstitutive CD40-Signale in B-Zellen zu Tumoren führen, wurde in unserer Arbeitsgruppe der konditionale transgene Mausstamm LMP1/CD40 generiert

(Homig-Holzel et al., 2008). In den transgenen Mäusen wurde das Fusionsgen *LMP1/CD40* in den *rosa26*-Genlokus inseriert. Die Fusion der Transmembrandomäne des viralen Proteins LMP1 (latent membrane protein 1) an den cytoplasmatischen Anteil von CD40 erzeugt ein konstitutives CD40-Signal. Die Expression von LMP1/CD40 kann durch eine loxP-flankierte Stop-Kassette zellspezifisch reguliert werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde dieser Mausstamm mit der CD19-cre-Linie verpaart, um eine B-zellspezifische Expression zu erreichen (Rickert et al., 1997).

Die B-zellspezifische Expression von LMP1/CD40 führte zu einer Splenomegalie, die größtenteils durch eine B-Zell-Expansion hervorgerufen wurde. Die LMP1/CD40-B-Zellen weisen wie CD40-stimulierte-B-Zellen einen aktivierten Phänotyp auf, was sich in einem verbesserten Überleben, einer verstärkten Proliferation und in einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und Aktivierungsmarkern widerspiegelt. Das konstitutive CD40-Signal führt zu einer konstitutiven Phosphorylierung der MAPKs Erk und Jnk sowie zu einer selektiven Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs. Nach circa 60 Wochen entwickelten 80 % der transgenen LMP1/CD40-Mäuse B-Zell-Lymphome, die vorwiegend in der Milz lokalisiert waren. Dadurch konnte gezeigt werden, dass deregulierte CD40-Signale zur Tumorentstehung führen können. Konstitutive NF- κ B-Signale führen zur aberranten Expression von Genen, die die Zellproliferation und das Überleben regulieren. Daher wurde ein konstitutives NF- κ B-Signal mit verschiedenen Lymphomen in Verbindung gebracht, wie z.B. mit Hodgkin-Lymphom und multiplen Myelom (Bargou, 1997; Feinman et al., 2004). In transgenen LMP1/CD40-Mäusen könnte die Tumorentstehung auch durch die konstitutive Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs hervorgerufen werden (Homig-Holzel et al., 2008).

2 Zielsetzung

CD40 spielt eine wichtige Rolle während der T-zellabhängigen (TD) Immunisierung und ist in deregulierter Form in diversen Lymphomen vorhanden. Um ein konstitutives CD40-Signal in B-Zellen zu untersuchen, wurde in unserem Labor der Mausstamm LMP1/CD40 generiert. Es konnte gezeigt werden, dass das konstitutive CD40-Signal zur B-Zell-Expansion und B-Zell-Lymphomagenese führt. In LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen sind die MAPK Erk und Jnk sowie der nicht kanonische NF- κ B Signalweg verstärkt aktiviert. Da auch in verschiedenen Lymphomen, wie in Hodgkin-Lymphomen oder Multiplen Myelomen der nicht kanonische NF- κ B Signalweg konstitutiv aktiv ist, sollte untersucht werden, inwieweit die selektive Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs einen Einfluss auf die B-Zell-Expansion in LMP1/CD40-Mäusen hat.

Um dies herauszufinden, sollten LMP1/CD40-Mäuse mit RelB^{fl/fl}- und IKK1^{fl/fl}-Mäusen gekreuzt und bezüglich der B-Zell-Expansion und B-Zell-Aktivierung untersucht werden. Obwohl LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen einen aktivierten Phänotyp haben, sind sie nicht fähig auf T-Zell-abhängige Antigene zu antworten. Deshalb sollte außerdem aufgeklärt werden, ob der konstitutiv aktive nicht kanonische NF- κ B Signalweg für den Block in der Keimzentrumsreaktion nach T-Zell-abhängiger Immunisierung verantwortlich ist.

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der kanonische NF- κ B Signalweg für die Erk-Phosphorylierung und die B-Zell-Expansion in den LMP1/CD40-Mäusen essentiell ist, da nach Inaktivierung von Nemo die B-Zellzahlen auf Kontrollniveau reduziert waren. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Verbindung zwischen Nemo und der Erk-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-B-Zellen herauszufinden.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs auf die LMP1/CD40-induzierte B-Zellexpansion und -Aktivierung

In LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen sind die MAPK, Jnk und Erk, sowie der nicht kanonische NF- κ B Signalweg konstitutiv aktiv (Homig-Holzel et al., 2008). Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit die Rolle des nicht kanonischen NF- κ B-Signalwegs in der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Expansion und -Aktivierung untersucht werden.

Um den nicht kanonischen NF- κ B Signalweg auszuschalten, wurden konditionale RelB^{fl/fl}- und IKK1^{fl/fl}-Mäuse mit LMP1/CD40^{fl/stopp}//CD19-cre-Mäusen verpaart (RelB^{fl/fl}//LMP1/CD40^{fl/stopp}//CD19-cre im Text als RelB//LMP1/CD40 bezeichnet und IKK1^{fl/fl}//LMP1/CD40^{fl/stopp}//CD19-cre im Text als IKK1//LMP1/CD40 bezeichnet). Zusätzlich wurden RelB^{fl/fl}//CD19-cre-, IKK1^{fl/fl}//CD19-cre- und CD19-cre-Mäuse untersucht (im folgenden RelB-Knockout-, IKK1-Knockout- und Kontroll-Mäuse genannt). Durch die B-zellspezifische Expression der Cre-Rekombinase wird in B-Zellen sowohl die Stopp-Kassette vor dem *LMP1/CD40*-Transgen entfernt als auch die mit loxP-Stellen flankierten Exons in den *RelB*- und *IKK1*-Genen. Somit entstehen Mäuse mit RelB- oder IKK1-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen. In dieser Arbeit werden die RelB//LMP1/CD40- und die IKK1//LMP1/CD40-Mäuse mit den LMP1/CD40-Mäusen (LMP1/CD40//CD19Cre) verglichen. Um zu untersuchen, ob auch die Einzel-Knockout-Mäuse (RelB- und IKK1-Knockout-Mäuse) einen Phänotyp aufweisen, wurden diese mit Kontrollmäusen (CD19-cre) verglichen. Wenn nicht anders vermerkt, waren die analysierten Mäuse zwischen 8 und 16 Wochen alt.

3.1.1 Expression und Lokalisation der NF- κ B Komponenten nach Inaktivierung von IKK1 und RelB in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen

Um zu untersuchen wie sich die Inaktivierung von IKK1 oder RelB auf die Expression und Prozessierung der NF- κ B Komponenten auswirkt, wurden Gesamtproteine aus B-Zellen von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen präpariert und mittels Western-Blot analysiert. In den RelB-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen war, wie zu erwarten, kein RelB-Protein detektierbar, was eine nahezu komplette Deletion des *RelB*-Gens anzeigt (Abbildung 7). Weiterhin war ein

verringerten p52-Level im Vergleich zu LMP1/CD40-B-Zellen zu erkennen. Wie zu erwarten, akkumulierten in den IKK1//LMP1/CD40-B-Zellen die p100-Proteine. Jedoch waren residuale Mengen von p52 immer noch vorhanden, d.h. die p100-Prozessierung war nicht vollkommen blockiert. Die RelB-Level waren ähnlich wie in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen.

Die Aktivität des kanonischen NF- κ B Signalwegs wurde durch die Inaktivierung von RelB und IKK1 nicht beeinflusst. Die basale I κ B α -Phosphorylierung war nur in Kontroll-B-Zellen, aber nicht in RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40- und LMP1/CD40-B-Zellen detektierbar. Die p105-Prozessierung zu p50 war in den RelB//LMP1/CD40- und IKK1//LMP1/CD40-B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen erhöht. Wie die Verteilung der unterschiedlichen NF- κ B Komponenten im Zytoplasma und Kern ist, sollte durch Kernfraktionierungsexperimente untersucht werden.

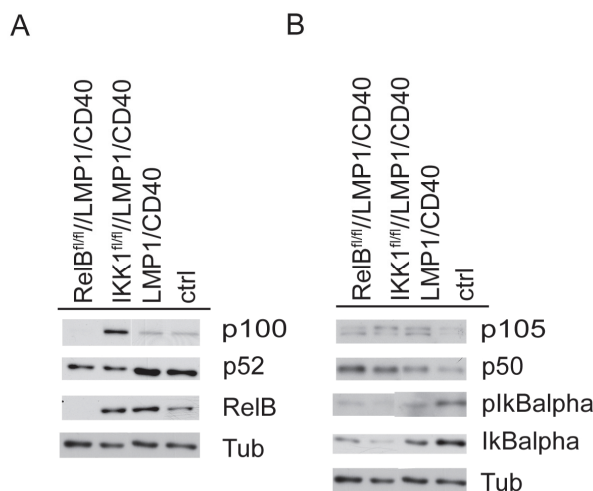


Abbildung 7 Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen p100/p52, P105/p50, RelB, pI κ B α und I κ B α inkubiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Im Kern von RelB- und IKK1//LMP1/CD40-B-Zellen wurde im Vergleich zu LMP1/CD40-B-Zellen weniger p52 nachgewiesen (Abbildung 8). Die detektierten p52-Mengen im Kern von IKK1- und RelB-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen waren vergleichbar zu denen von Kontroll-B-Zellen und somit deutlich niedriger als im Kern von LMP1/CD40-B-Zellen. Die residualen Level von p52 im Kern von IKK1//LMP1/CD40-B-Zellen bestätigen die unvollständige Hemmung der p100-Prozessierung. Die geringere Prozessierung von p100 zu p52 in den RelB//LMP1/CD40-B-Zellen könnte durch einen verstärkten Abbau von p100, in Abwesenheit von RelB, zurückgeführt werden (Maier et al., 2003). Dies erklärt auch die deutlich geringen Mengen an p100 in RelB//LMP1/CD40-B-Zellen im Vergleich zu LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen, die bei der Analyse der Gesamtproteine im Westernblot detektiert wurden (siehe Abbildung 7). In IKK1-

defizienten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen waren die RelB-Mengen im Kern ähnlich wie in LMP1/CD40-B-Zellen und somit im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen deutlich erhöht.

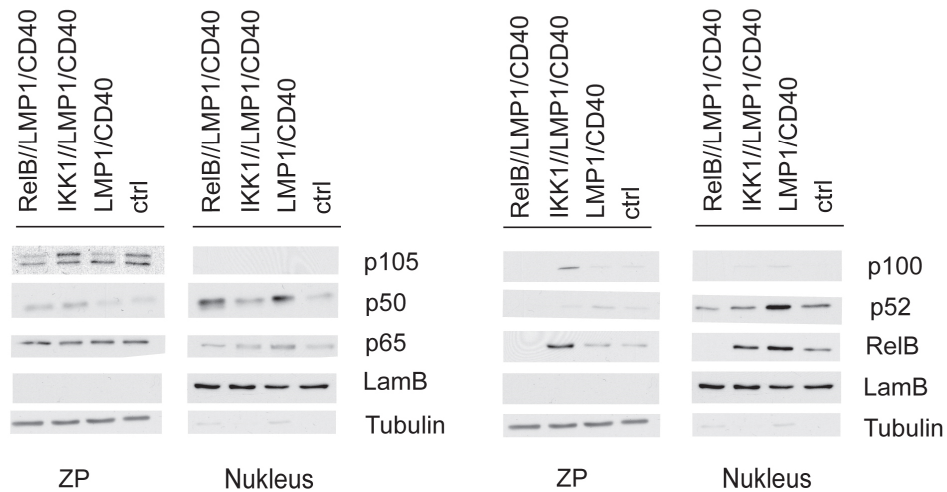


Abbildung 8 Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen beeinflusst die Prozessierung und Lokalisation von RelB, p52 und p50. Die NF- κ B Protein-Level von p105/p50, p65, p100/p52, und RelB im Zytosol (ZP) und im Nukleus in B-Zellen von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40- und Kontroll-(ctrl)-Mäusen wurden mittels Western-Blot analysiert. Die Reinheit der Kernfraktionierung wurde mit Tubulin (ist nur im ZP vorhanden) und dem Kernmarker Lamin B (LamB) überprüft. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten.

Die Level der NF- κ B Komponenten des kanonischen NF- κ B Signalwegs waren nach Inaktivierung von IKK1 und RelB nicht verändert. So waren die p50-Level im Kern von RelB//LMP1/CD40- und IKK1//LMP1/CD40-B-Zellen vergleichbar mit B-Zellen der LMP1/CD40-Mäuse und im Vergleich zu den Kontroll-B-Zellen erhöht. Die signifikanten Unterschiede in der Translokation der NF- κ B Komponenten in den Nukleus konnte durch Quantifizierung der Western-Blot-Filme ermittelt werden (Abbildung 9). Die beobachteten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: (I) Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führt zu einer verringerten Prozessierung von p100 zu p52. (II) Die konstitutive p105-Prozessierung zu p50 ist von der Deletion von RelB oder IKK1 nicht beeinträchtigt. (III) Nach Deletion von IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen werden immer noch RelB-p52 Dimere gebildet und in den Kern transloziert. (IV) Nach RelB-Inaktivierung sind die p52-Level im Kern ähnlich wie in Kontroll-B-Zellen und somit im Vergleich zu LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen deutlich erniedrigt.

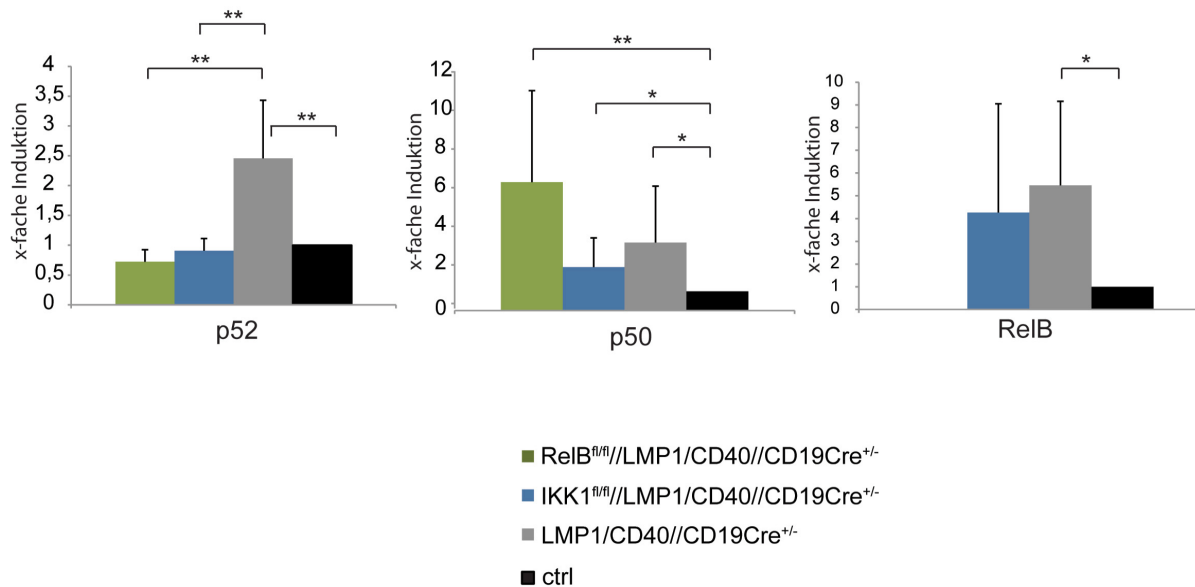


Abbildung 9 Quantifizierung von Western-Blot-Filmen. Gezeigt ist die x-fache Induktion von p52, p50 und RelB im Nukleus der B-Zellen von RelB^{fl/fl}//LMP1/CD40- (grün), IKK1^{fl/fl}//LMP1/CD40- (blau), LMP1/CD40-Mäusen (grau) im Vergleich zu Kontroll-(ctrl; schwarz)-Mäusen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem ImageJ-Programm. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. * P < 0,05, ** P < 0,01; berechnet mit dem zweiseitigen t-Test. n=4-8.

3.1.2 Die konstitutive Aktivierung des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs führt zu einem partiellen Block der B-Zell-Entwicklung und zu einer verminderten Anzahl von rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark

Guo und seine Kollegen konnten zeigen, dass Mäuse, die nur p52, aber nicht den Inhibitor p100 exprimieren, einen Block in der B-Zell-Entwicklung im Prä-Pro-B-Zell-Stadium zeigen. Da in diesen Mäusen RelB/p52-Dimere kontinuierlich in den Kern transloziert werden, wurde vermutet, dass die konstitutive Aktivierung des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs in frühen B-Zellstadien für die beeinträchtigte B-Zell-Entwicklung verantwortlich ist (Guo et al., 2008).

Es sollte untersucht werden, ob die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF-κB-Signalwegs in B-Zellen von LMP1/CD40-Mäusen, ebenfalls zu einem Block in der B-Zell-Entwicklung führt. Deshalb wurde aus den Knochenmarkszellen die Gesamtzahl der B-Zellen und die Anteile der verschiedenen Reifestadien nach Färbung mit unterschiedlichen Oberflächenmarker, wie B220, IgM, IgD und CD43 im FACS in RelB^{fl/fl}//LMP1/CD40- und IKK1^{fl/fl}//LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen untersucht.

Die B-Zellzahlen im Knochenmark der transgenen LMP1/CD40-Mäuse waren im Vergleich zu den Kontrollmäusen erniedrigt (Abbildung 10). In RelB- und IKK1-defizienten LMP1/CD40-Mäusen waren dagegen die B-Zellzahlen im Knochenmark ähnlich wie in

RelB-Knockout-, IKK1-Knockout- und Kontroll-Mäusen. Dies weist darauf hin, dass der aktive nicht kanonische NF- κ B Signalweg für die erniedrigten B-Zellzahlen im Knochenmark der transgenen LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich ist.

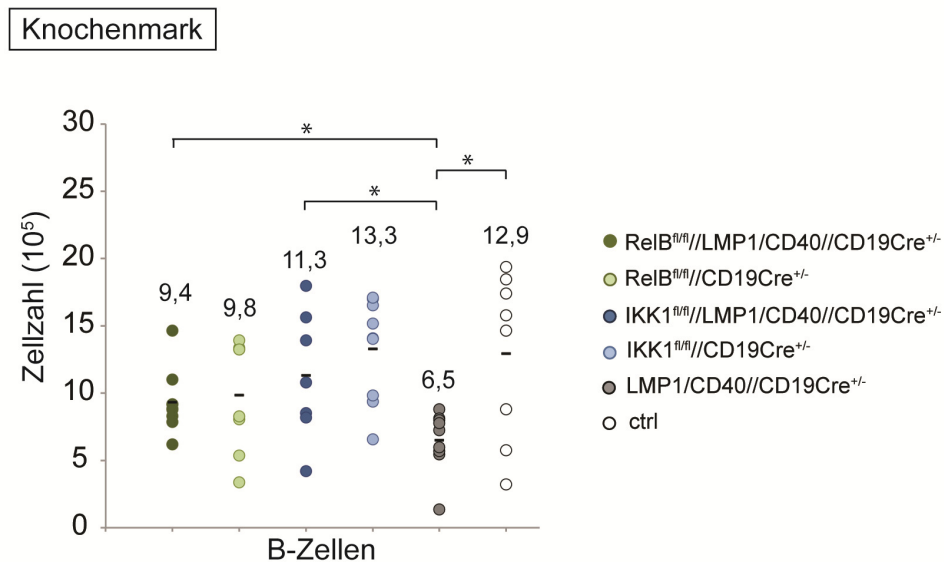


Abbildung 10 Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen hebt die B-Zellzahlen im Knochenmark wieder auf das Kontrollniveau an. Dargestellt ist die Analyse der B-Zellzahlen (B220⁺) der RelB//LMP1/CD40-, RelB-Knockout-, IKK1//LMP1/CD40-, IKK1-Knockout-, LMP1/CD40-, und Kontroll-Mäuse. Der schwarze Balken zeigt den Mittelwert an. * P < 0,05 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; n=8-11.

Um zu untersuchen, ob die reduzierten B-Zellzahlen im Knochenmark von LMP1/CD40-Mäusen auf eine bestimmte B-Zell-Population zurückgeführt werden kann, oder ob alle Reifungsstadien gleichmäßig reduziert sind, wurde die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark näher untersucht. Mit Hilfe einer B220- und CD43-Färbung können Pro-B-Zellen (B220^{niedrig}CD43⁺), Prä-B-Zellen (B220^{niedrig}CD43⁻) sowie rezirkulierende B-Zellen (B220^{hoch}CD43⁻) voneinander unterschieden werden (Abbildung 11A). Die prozentualen Anteile der Pro-, Prä- und unreifen B-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen (Abbildung 11B). Jedoch ergab die Kalkulation der Gesamtzellzahlen (Tabelle 3), dass die Pro-, Prä- und unreifen B-Zellen in LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen verringert waren. Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen konnte die Pro-, Prä- und unreifen B-Zellzahlen wieder auf Kontrollniveau anheben. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich ein konstitutiv aktiver nicht kanonischer NF- κ B Signalweg negativ auf die B-Zell-Entwicklung auswirkt.

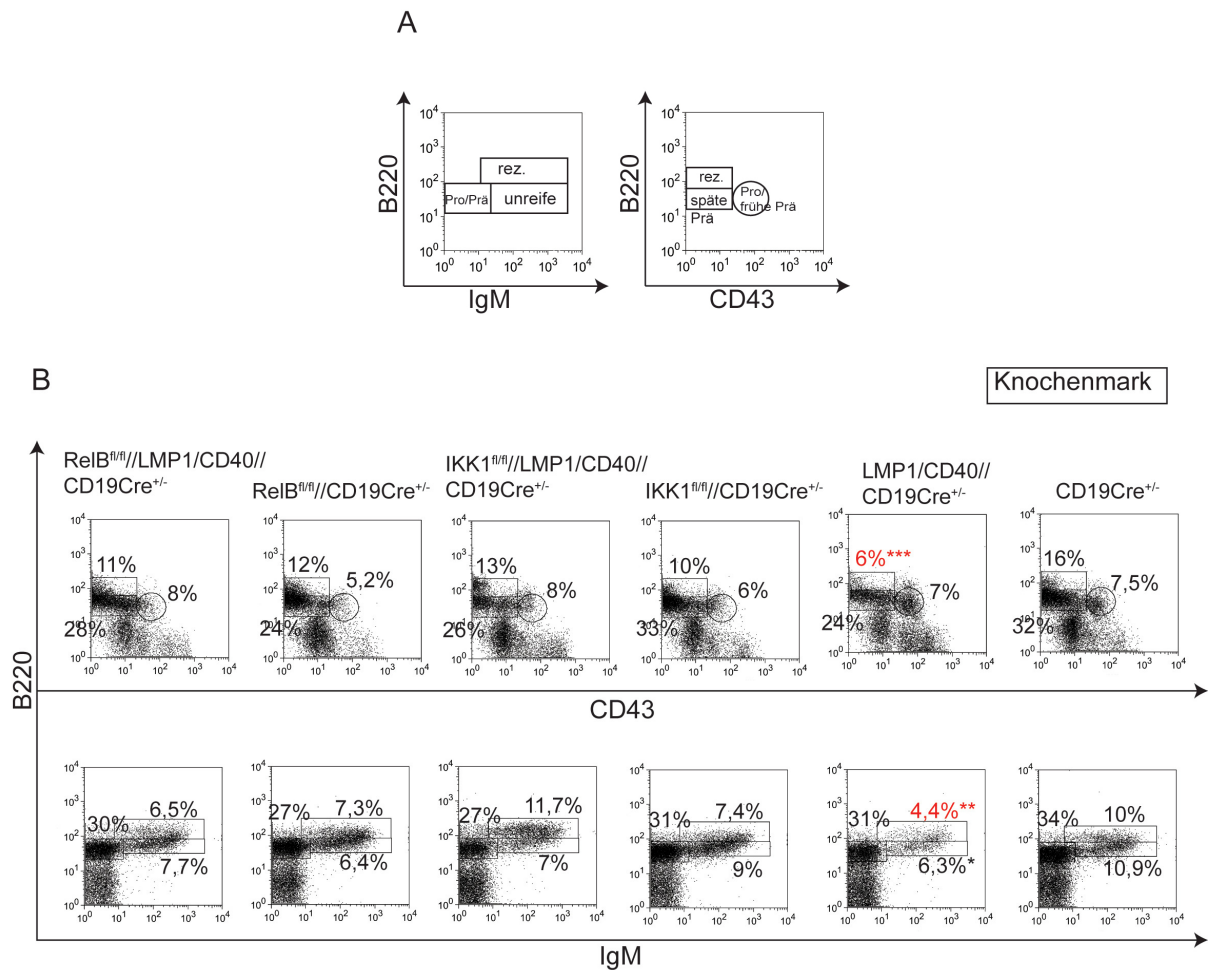


Abbildung 11 Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg ist für die verminderte Anzahl von Pro-, Prä-, unreifen und rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark der LMP1/CD40-Mäuse verantwortlich. (A) Mit Hilfe einer B220-IgM-Färbung können Pro/Prä- ($B220^{\text{niedrig}}\text{IgM}^-$), rezirkulierende ($B220^{\text{hoch}}\text{IgM}^+$) und unreife B-Zellen ($B220^{\text{niedrig}}\text{IgM}^+$) bestimmt werden. Mittels einer B220-CD43-Färbung können Pro- und frühe Prä ($B220^{\text{niedrig}}\text{CD43}^+$), Prä- ($B220^{\text{niedrig}}\text{CD43}^-$) und rezirkulierende B-Zellen ($B220^{\text{hoch}}\text{CD43}^-$) bestimmt werden. **(B)** Gezeigt ist eine repräsentative Durchflusszytometrieanalyse zur Bestimmung unterschiedlicher B-Zell-Entwicklungsstadien im Knochenmark. Die FACS-Plots sind auf Lymphozyten vorgefiltert. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Mäusen. $n=6-10$.

Eine weitere Färbung mit B220 und IgM zeigte, dass das Verhältnis der Pro/Prä-B-Zellen ($B220^{\text{niedrig}}\text{IgM}^-$) zu unreifen B-Zellen ($B220^{\text{niedrig}}\text{IgM}^+$) durch die Deletion von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen nicht beeinflusst wurde (Abbildung 11B). Ein deutlicher Block in der B-Zell-Entwicklung war auch bei dieser Färbung nicht zu beobachten. Diese Daten weisen darauf hin, dass in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen alle frühen Entwicklungsstadien der B-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-B-Zellen zu einem ähnlichen Maße reduziert sind. Die Inaktivierung von RelB bzw. IKK1 hebt diese Reduktion auf.

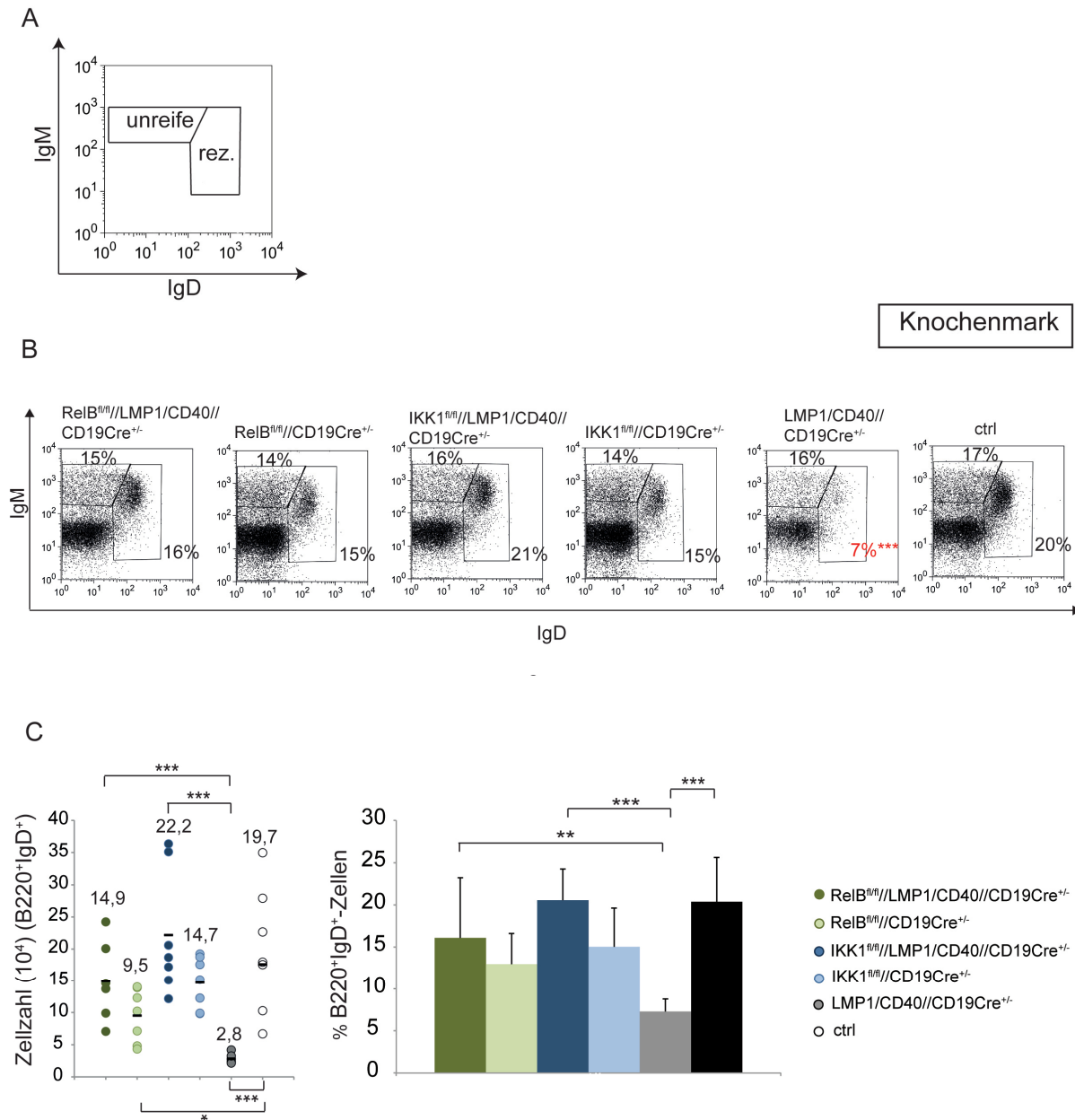


Abbildung 12 Die IgD⁺-Zellen sind in den RelB^{fl/fl}/LMP1/CD40- und IKK1^{fl/fl}/LMP1/CD40-Mäusen wieder auf Kontrollniveau erhöht. (A) Bestimmung der rezirkulierenden (IgD⁺) und unreifen B-Zellen (IgD-IgM⁺) im Knochenmark. **(B)** Dargestellt ist eine repräsentative Durchflusszytometrieanalyse der Knochenmarkszellen. Im FACS-Plot sind Lymphozyten gezeigt. **(C)** Absolute Zellzahlen und prozentualer Anteil der B220⁺IgD⁺-B-Zellen im Knochenmark. Der schwarze Balken kennzeichnet den Durchschnittswert. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; * = Vergleich mit Kontrollmaus (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Maus. n=6-9.

Beide Färbungen weisen darauf hin, dass das konstitutive CD40-Signal zu einer Reduktion der rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark führt. Um dies zu bestätigen, wurden die Knochenmarkszellen mit anti-IgM- und anti-IgD-Antikörpern angefärbt. Hiermit lassen sich die rezirkulierenden B-Zellen (IgD⁺) von den unreifen B-Zellen (IgD-IgM⁺) klar unterscheiden (Abbildung 12A). Diese Daten zeigen, dass der prozentuale Anteil der

rezirkulierenden B-Zellen in den transgenen LMP1/CD40-Mäusen (7%) im Vergleich zu Kontrollmäusen (20%) erniedrigt ist (Abbildung 12B und C). Die Deletion von RelB und IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führte dazu, dass sowohl der prozentuale Anteile als auch die Zellzahl der rezirkulierenden B-Zellen wieder auf Kontrollniveau waren. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs an der Reduktion der rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark von LMP1/CD40-Mäusen hin.

Die RelB- und IKK1-Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu Kontrollmäusen keine Unterschiede in der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark, nur die rezirkulierenden B-Zellen waren in den RelB-Knockout-Mäusen reduziert.

Tabelle 3 Prozentualer Anteil und Zellzahlen der B-Zellpopulationen im Knochenmark. Die Milzzellen der genannten Genotypen wurden mit α -IgM, α -IgD, α -B220, und α -CD43 gefärbt und mittels eines Durchflusszytometers analysiert. Die prozentualen Anteile wurden mit den Gesamtzellzahlen verrechnet. * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Mäusen. * P < 0,05, ** P < 0,01 *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test.

B-Zellpopulationen im Knochenmark				
%				
	IgM ⁻ B220 ^{low} CD43 ⁺ Pro B	IgM ⁻ B220 ^{low} CD43 ⁻ Prä B	B220 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ unreife B	B220 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺ rez B
RelB ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	7±2	28±12	15±4	16±7*
RelB ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	5±2	25±15	14±5	13±3,6*
IKK1 ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	9±4	26±9	16±3	21±4***
IKK1 ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	7±2	33±8	14±4	15±5
LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	5±1	24±4	16±3	7±1,5***
CD19Cre ^{+/-}	7±2	32±9	17±2	20±5
[x10 ⁵]				
RelB ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	1,4±0,7*	5,4±2,4**	1,5±0,6**	1,5±0,6***
RelB ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	0,8±0,5	4,3±1,6	1,0±0,7	1,0±0,4*
IKK1 ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	1,5±0,9*	6,0±2,5	1,8±0,9**	2,2±0,9***
IKK1 ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	1,3±0,6	4,9±2,9	1,5±0,5	1,5±0,3
LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	0,7±0,2*	2,5±0,4*	0,6±0,1**	0,28±0,08***
CD19Cre ^{+/-}	1,76±1,1	7,4±5,6	1,7±0,8	1,97±0,98

3.1.3 Die Deletion von IKK1 aber nicht von RelB führt zu erniedrigten Zellzahlen in der Milz der transgenen LMP1/CD40-Mäuse

Transgene LMP1/CD40-Mäuse haben im Vergleich zu Kontrollmäusen eine vergrößerte Milz (Homig-Holzel et al., 2008). Die Splenomegalie ist größtenteils auf eine B-Zell-Expansion zurückzuführen. Um zu untersuchen, ob die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs an der B-Zell-Expansion in transgenen LMP1/CD40-

Mäusen beteiligt ist, wurden das Milzgewicht, die Gesamt- und B-Zellzahlen von RelB^{fl/fl}/LMP1/CD40⁻, IKK1^{fl/fl}/LMP1/CD40⁻-Mäusen analysiert und mit LMP1/CD40⁻ und Kontroll-Mäusen sowie den Einzel-Knockout-Mäusen verglichen.

Das Milzgewicht, die Gesamt- und die B-Zellzahlen von RelB^{fl/fl}/LMP1/CD40⁻-Mäusen waren vergleichbar mit denen von LMP1/CD40⁻-Mäusen (Abbildung 13). Dies deutet darauf hin, dass RelB nicht für die B-Zell-Expansion in den LMP1/CD40⁻-Mäusen notwendig ist. Die Inaktivierung von IKK1 in den LMP1/CD40⁻-exprimierenden B-Zellen führte zu einer Reduktion des Milzgewichts, der Gesamt- und B-Zellzahlen, wobei die B-Zellzahlen im Vergleich zu Kontrollmäusen immer noch erhöht waren (Abbildung 13). Diese Daten zeigen, dass die Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs nur einen begrenzten Einfluss auf die B-Zell-Expansion in den transgenen LMP1/CD40⁻-Mäusen hat.

Milz

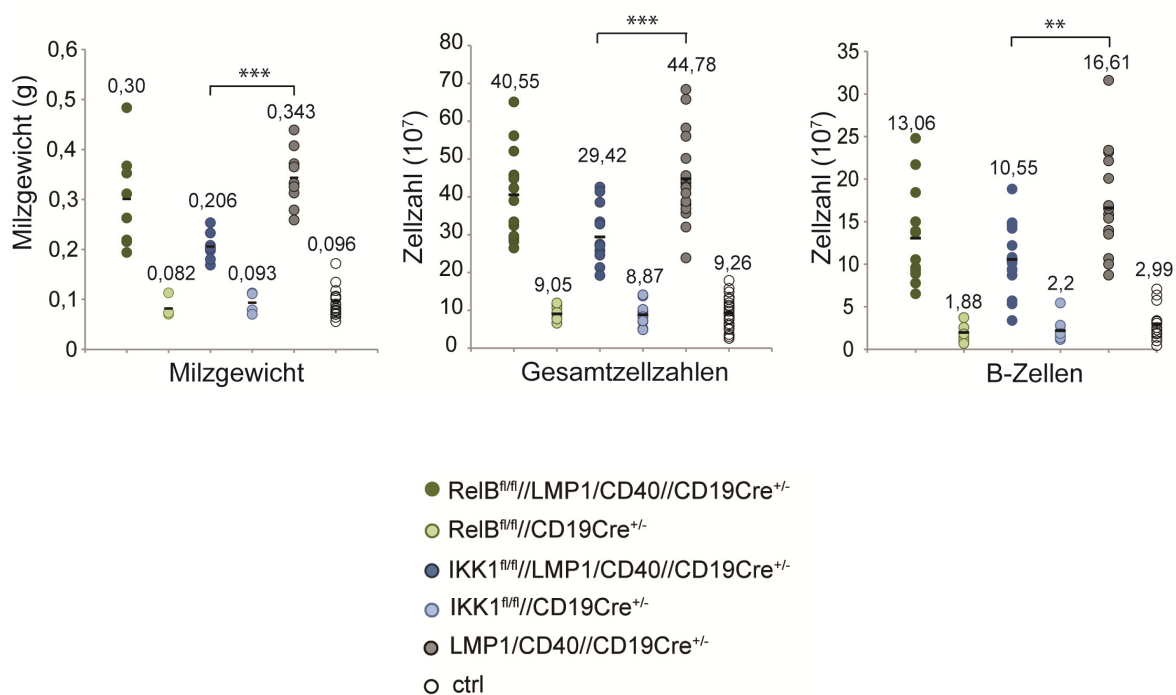


Abbildung 13 Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalweg hat nur einen begrenzten Einfluss auf die B-Zell-Expansion in den LMP1/CD40⁻-Mäusen. Dargestellt sind das Milzgewicht, die Gesamt- und B-Zellzahlen der genannten Genotypen. Um die totalen B-Zellzahlen zu ermitteln, wurden die Zellen mit TOPRO-3 gefärbt, um tote Zellen auszuschließen, und mit α B220, um die B-Zellen zu identifizieren. Die prozentualen Anteile der B-Zellen wurden mit den Gesamtzellzahlen verrechnet. Die Gesamtzellzahlen wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Durchschnittswerte sind durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. ** P < 0,01, *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; n=8-21.

3.1.4 Die B-Zell-Expansion in den RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40- und LMP1/CD40-Mäusen beginnt ab dem T2-B-Zell-Stadium

Unreife IgM-positive B-Zellen wandern aus dem Knochenmark als sogenannte transitionelle B-Zellen über den Blutstrom in die Milz (T1-B-Zellen). Transitionelle B-Zellen entwickeln sich in der Milz zu T2-B-Zellen und T3-B-Zellen. Abbildung 14 zeigt den prozentualen Anteil der AA4.1-positiven transitionellen B-Zellen in LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Der prozentuale Anteil der transitionellen B-Zellen (B220⁺AA4.1⁺) war in den LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen erniedrigt (Abbildung 14), jedoch war die Gesamtzellzahl transitioneller B-Zellen in LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen vergleichbar (Tabelle 4). Den gleichen Phänotyp konnte man nach Inaktivierung von RelB und IKK1 in LMP1/CD40-Mäusen beobachten (Abbildung 15).

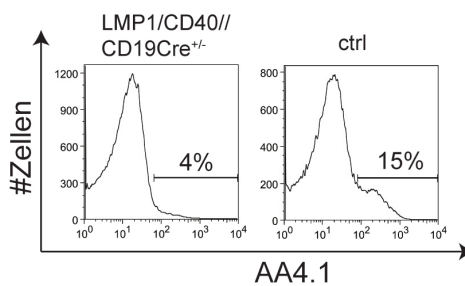


Abbildung 14 Anteil der transitionellen B-Zellen. Gezeigt ist der prozentuale Anteil von AA4.1-positiven Milzzellen von LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen. Der FACS-Plot bezieht sich auf B220⁺ Lymphozyten.

Dies weist darauf hin, dass in Anwesenheit von LMP1/CD40 die reifen B-Zellen stärker als die transitionellen AA4.1⁺-B-Zellen expandieren und deshalb der prozentuale Anteil der transitionellen B-Zellen in LMP1/CD40-Mäusen erniedrigt ist. Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 scheint diesen Phänotyp nicht zu beeinflussen (Abbildung 15).

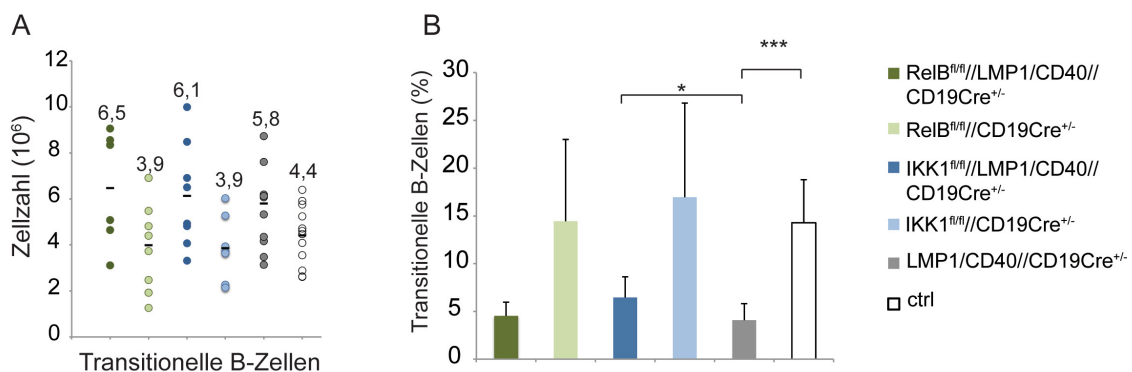


Abbildung 15 Die Inaktivierung von RelB und IKK1 hat keinen Einfluss auf die Anzahl transitioneller B-Zellen in der Milz von LMP1/CD40-Mäusen. (A) Gezeigt sind die Zellzahlen und der prozentuale Anteil der transitionellen B-Zellen (B220⁺AA4.1⁺). Der Durchschnittswert ist durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. (B) Der prozentuale Anteil der transitionellen B-Zellen in der Milz aller genannten Genotypen ist dargestellt. * P < 0,05, *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; n=7-14.

Um die Verteilung der T1-, T2- und T3-B-Zellen näher zu charakterisieren, wurden die Differenzierungsstadien mit einer IgM/CD23-Färbung näher unterteilt (Abbildung 16A). Die T1-B-Zellen ($B220^{+}AA4.1^{+}IgM^{hoch}CD23^{-}$) waren in den transgenen LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen prozentual reduziert (Abbildung 16B).

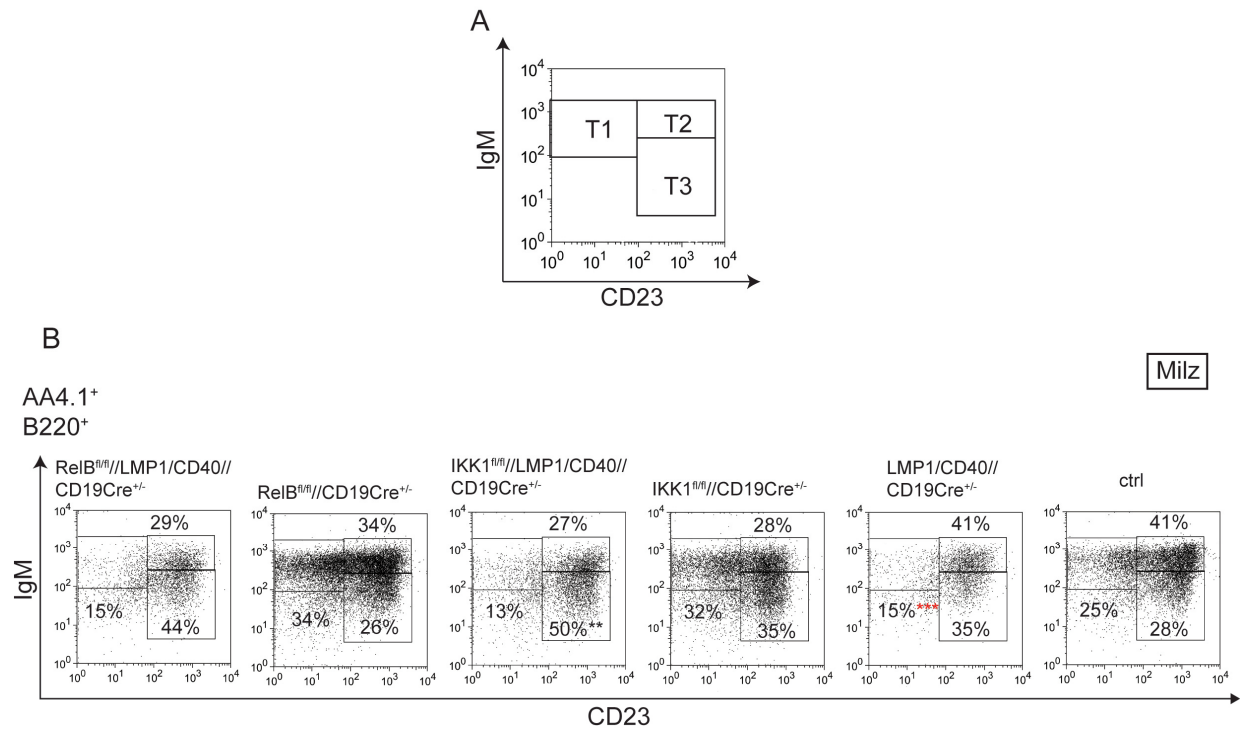


Abbildung 16 Die Expansion der B-Zellen in den LMP1/CD40-Mäusen beginnt unabhängig vom nicht kanonischen NF- κ B Signalweg ab dem T2-B-Zellstadium. (A) Mit Hilfe einer AA4.1-IgM- und CD23-Färbung können die transitionellen B-Zellen in ihre verschiedenen Entwicklungsstadien unterteilt werden: T1- ($IgM^{hoch}CD23^{-}$), T2- ($IgM^{hoch}CD23^{hoch}$) und T3-B-Zellen ($IgM^{niedrig}CD23^{hoch}$). **(B)** Dargestellt ist eine repräsentative Durchflusszytometrieanalyse von B220⁺AA4.1⁺ Lymphozyten aus der Milz von den genannten Genotypen. ** P<0,01, *** P <0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Mäusen. n=8-12.

Die absoluten Zellzahlen waren jedoch vergleichbar wie in den (CD19-cre) Kontrollmäusen. Die Deletion von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen änderte nichts an der prozentual erniedrigten T1-B-Zellpopulation und der Gesamtzellzahl der T1-B-Zellen. Sowohl die prozentualen Anteile als auch die Zellzahlen der T2- ($B220^{+}AA4.1^{+}IgM^{hoch}CD23^{hoch}$) und T3-B-Zellen ($B220^{+}AA4.1^{+}IgM^{niedrig}CD23^{hoch}$) waren in den RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40- und LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen erhöht (Abbildung 16 und Tabelle 4). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Influx der unreifen B-Zellen aus dem Knochenmark und die Weiterentwicklung der transitionellen B-Zellen in der Milz durch die Inaktivierung von RelB oder IKK1 nicht beeinflusst werden. Die prozentualen Anteile und die

Gesamtzellzahlen der Differenzierungsstadien T1, T2 und T3 legen nahe, dass die B-Zell-Expansion in den LMP1/CD40-, RelB//LMP1/CD40- und IKK1//LMP1/CD40-Mäusen ab dem T2-B-Zell-Stadium beginnt.

Tabelle 4 Prozentualer Anteil und Zellzahlen der transitionellen B-Zellen in der Milz. Milzzellen von den genannten Genotypen wurden mit α B220, α AA4.1, α CD23 und α IgM gefärbt und mittels eines Durchflusszytometers analysiert. Die prozentualen Anteile wurden mit den Gesamtzellzahlen verrechnet. * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Mäusen. * P < 0,05, ** P < 0,01 *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test, n=8-12.

Transitionelle B-Zellen in der Milz		(n=6-13)			
	Transitionelle T1		T2	T3	
	B220 ⁺ AA4.1 ⁺	B220 ⁺ AA4.1 ⁺	B220 ⁺ AA4.1 ⁺	B220 ⁺ AA4.1 ⁺	
	IgM ⁺ CD23 ⁻		IgM ^{hoch} CD23 ⁺	IgM ^{niedrig} CD23 ⁺	
	(%)				
RelB ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	4,8±1,4	17,8±2,4	37±8,6	30,6±8,0	
RelB ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	20±6	30±5,4	39±7	22,7±3,1	
IKK1 ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	6,3±1,6*	13,3±2,9	32±4,7	40,5±6**	
IKK1 ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	18±5,5	32±7,8	30±5,9	28±6,2	
LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	4,4±1,8***	14±4,2***	39,7±10	31±8**	
CD19Cre ^{+/-}	16,5±4,7	31±7,5	34±6	24±3,6	
	[x10 ⁶]	[x10 ⁵]	[x10 ⁵]	[x10 ⁵]	
RelB ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	6,4±2,8	11,2±6	22±11,7	17±6	
RelB ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	3,9±2	10±6	15,2±7,8	9±5,3	
IKK1 ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	6,1±2,3	11,3±6,8	23,7±9,3	31±11**	
IKK1 ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	3,8±1,4	10,5±6,6	8,9±5,2*	8,5±4,9	
LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	5,8±1,9	9,9±3,3	25,4±13,7*	16,5±4,4**	
CD19Cre ^{+/-}	4,4±1,3	13±6,7	15,7±5,8	9,7±4,7	

3.1.5 Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs beeinflusst den Phänotyp und die Lokalisation von MZ-B-Zellen in LMP1/CD40-Mäusen

Durch Färbungen mit den Antikörpern IgM und IgD können die Fo-B-Zellen (IgM⁺IgD^{hoch}) von transitionellen-, MZ-B- und B1-Zellen (IgM^{hoch}IgD^{niedrig}) unterschieden werden. In Abbildung 17 ist die prozentuale Erhöhung der IgM^{hoch}IgD^{niedrig}-Zellen der transgenen LMP1/CD40-Mäuse (21%) im Vergleich zu Kontrollmäusen (11%) zu erkennen. Die Inaktivierung von IKK1, aber nicht von RelB, führte zu einer prozentualen Abnahme der IgM⁺IgD^{niedrig}-Zellen in LMP1/CD40-Mäusen.

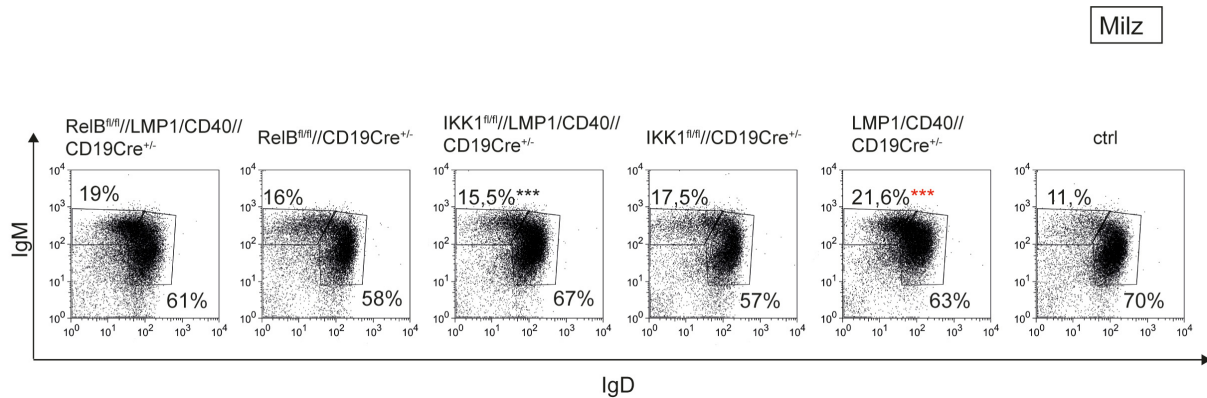


Abbildung 17 Die Deletion von IKK1 in den LMP1/CD40-B-Zellen führt zu einer Erniedrigung der IgM⁺IgD^{niedrig}-Population. Gezeigt ist eine repräsentative Durchflusszytometrieanalyse von B220⁺-Lymphozyten in der Milz der genannten Genotypen. Mittels einer IgM- und IgD-Färbung können die follikulären B-Zellen (IgM⁺gD^{hoch}) von den Transitionalen-, MZ-B- und B1-Zellen (IgM⁺gD^{niedrig}) unterschieden werden. *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Mäusen. n=7-11.

Um herauszufinden, ob dieser Phänotyp durch eine Verschiebung der Anteile von Marginalzonen- (MZ-B; CD21^{hoch}CD23^{niedrig}) und follikulären (Fo; CD21⁺CD23⁺) B-Zellen verursacht wird, wurden die Anteile der MZ-B- und Fo-B-Zellen mit einer CD21/CD23-Färbung bestimmt (Abbildung 18A). Die Deletion von IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führte dazu, dass der prozentuale Anteil der MZ-B-Zellen auf Kontrollniveau sank (Abbildung 18B). Die Berechnung der Zellzahlen ergab, dass die MZ-B-Zellen in den IKK1//LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu LMP1/CD40-Mäusen signifikant erniedrigt waren. Sowohl die prozentualen Anteile als auch die Zellzahlen der MZ-B-Zellen der RelB//LMP1/CD40-Mäuse waren im Vergleich zu LMP1/CD40-Mäusen leicht erniedrigt (Abbildung 18B und C).

Die Kalkulation der Zellzahlen der Fo-B-Zellen zeigte, dass in RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40- und LMP1/CD40-Mäusen die Fo-B-Zellen im Vergleich zu den Zellzahlen in den Kontrollmäusen (CD19-cre) und den Einzel-Knockout-Mäusen (RelB und IKK1) signifikant erhöht waren. Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Fo-B-Zellen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die erniedrigten B-Zellzahlen in IKK1//LMP1/CD40-Mäusen hauptsächlich durch die Abnahme der MZ-B- aber nicht der Fo-B-Zellen verursacht wird.

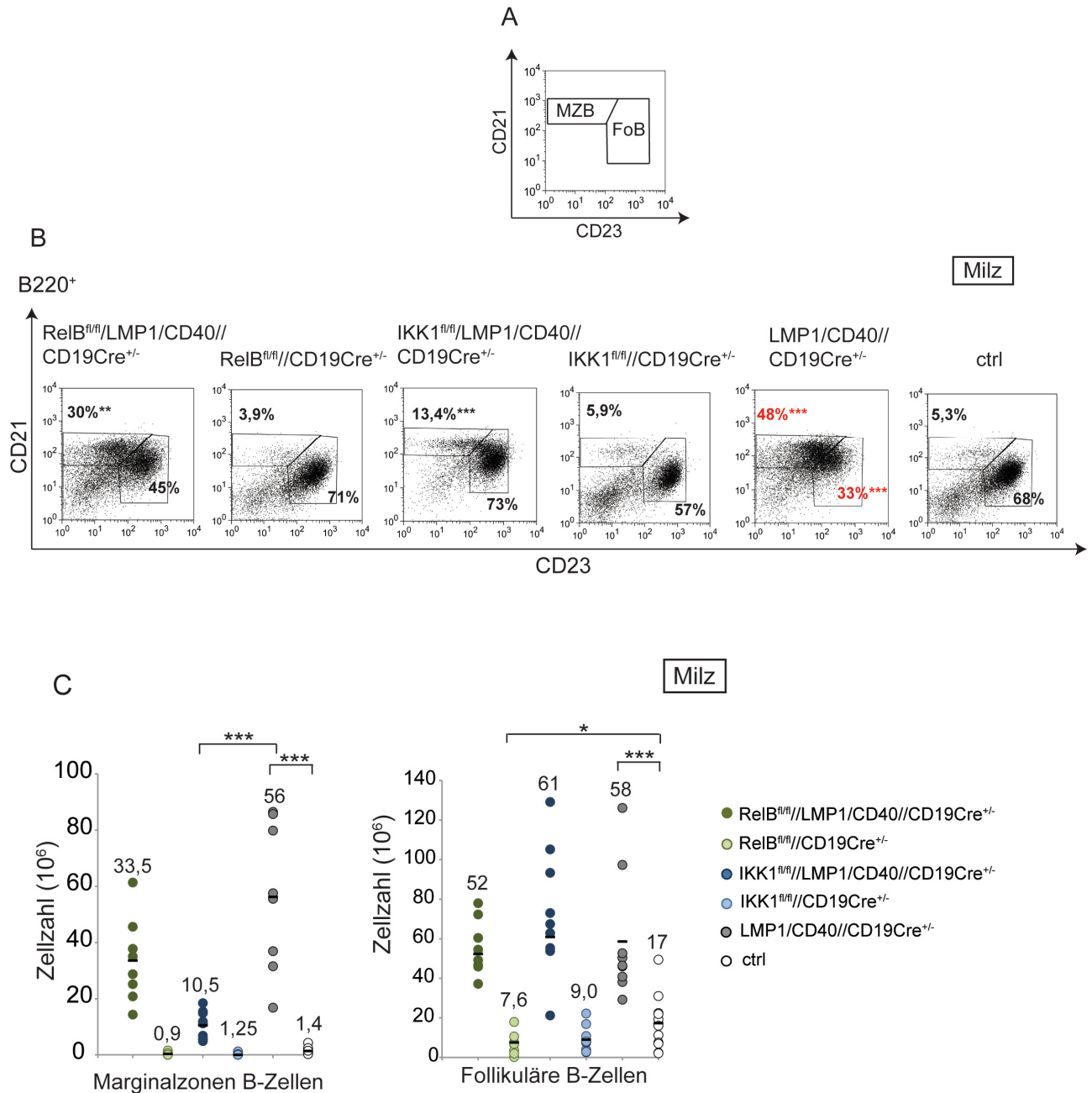


Abbildung 18 Die Inaktivierung von IKK1 führt zu einer Abnahme der MZ-B- aber nicht Fo-B-Zellen in der Milz. (A) Schematische Darstellung wie MZ-B- (B220⁺CD21^{hoch}CD23^{niedrig}) und Fo-B-Zellen (B220⁺CD21^{hoch}CD23⁺) bestimmt werden können. **(B)** Gezeigt ist eine repräsentative Durchflusszytometrieanalyse von B220⁺-Lymphozyten, die mit α -CD21 und α -CD23 gefärbt wurden. **(C)** Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden die prozentualen Anteile mit den Gesamtzellzahlen verrechnet. Der schwarze Balken gibt den Durchschnittswert an. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Mäusen. n=8-10.

3.1.6 Die Marginalzonen-B-Zellen siedeln sich in den LMP1/CD40-Mäusen nach Deletion von RelB oder IKK1 vermehrt in der Marginalzone an

Da die CD21/CD23-Färbung zeigte, dass die MZ-B-Zellen in den RelB//LMP1/CD40-Mäusen immer noch erhöht waren, sollte immunhistologisch untersucht werden, ob diese in der Marginalzone lokalisiert sind. Es wurden Gefrierschnitte der Milz von den verschiedenen Genotypen angefertigt und mit α -MOMA1-Antikörpern (dunkelblau) die metallophilen Makrophagen bzw. mit α -IgM-Antikörpern die B-Zellen (rot) angefärbt. Die metallophilen Makrophagen befinden sich entlang des Marginalsinus, welcher die Marginalzone vom Follikel abgrenzt.

Charakteristisch für LMP1/CD40-Mäuse ist die starke Akkumulation von B-Zellen in den Follikeln, ein im Vergleich zu Wildtypzellen weniger kompakter sondern eher diffuser Moma-Ring, der von den metallophilen Makrophagen gebildet wird und eine vergleichbar schmale Marginal-B-Zellzone, die nicht die massive Expansion der MZ-B-Zellen, die im FACS sichtbar war, widerspiegelt (Abbildung 19). Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen hoben die LMP1/CD40-induzierte Vergrößerung der Follikel teilweise auf. Im Vergleich zu den LMP1/CD40-Mäusen erscheint in den RelB//LMP1/CD40- und IKK1//LMP1/CD40-Mäusen der Moma-Ring wieder kompakter und die Marginal-B-Zellzone (roter Pfeil) breiter.

S1PR-1 und Chemokin-Rezeptoren, wie CCR7, CXCR4 und CXCR5 regulieren die Wanderung und Retention von B-Zellen (Cyster et al., 2002). S1PR-1 ist für die B-Zell-Wanderung in die Marginalzone essentiell (Cinamon et al., 2004). CXCR5 ist ein bedeutender Chemokin-Rezeptor, der nur auf reifen B-Zellen exprimiert wird (Bowman et al., 2000; Forster et al., 1994). Aktivierte B-Zellen regulieren CCR7 hoch, wodurch sie im Follikel in die T-Zellzone wandern können (Okada et al., 2002; Reif et al., 2002). CXCR4 wird auf allen B-Zellen exprimiert. Cyster und seine Kollegen konnten zeigen, dass in Mäusen mit CXCR4-defizienten B-Zellen weniger MZ-B-Zellen in der Marginalzone vorhanden waren (Nie et al., 2004). Daher sollte die CXCR4-Expression in den unterschiedlichen Genotypen untersucht und verglichen werden. Abbildung 20A zeigt, dass die CXCR4-Expression in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen (grau ausgefüllt) im Vergleich zu den Kontroll-B-Zellen (schwarze Linie) signifikant erniedrigt war. Die Deletion von RelB (dunkelgrüne Linie) oder IKK1 (dunkelblaue Linie) in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen erhöhte die CXCR4-Expression wieder auf Kontrollniveau.

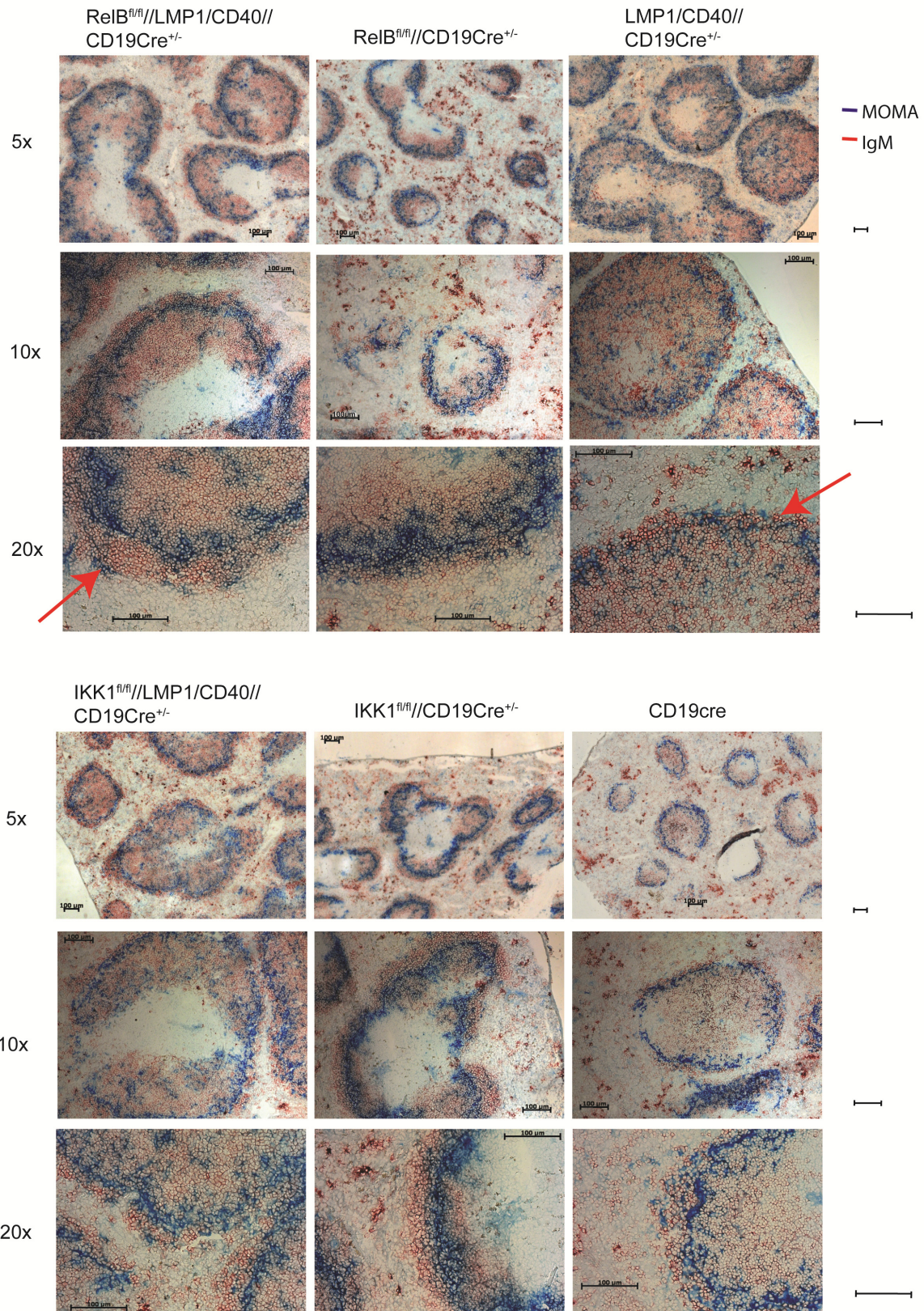


Abbildung 19 Nach Inaktivierung von RelB oder IKK1 in LMP1/CD40-B-Zellen sitzen die MZ-B-Zellen vermehrt in der Marginalzone. Die Milzschnitte von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40-, RelB-Knockout-, IKK1-Knockout- und Kontroll-Mäusen wurden mit α -MOMA-Antikörpern (metallophile Makrophagen; blau) und α -IgM-Antikörpern (B-Zellen; rot) gefärbt. Der Balken entspricht 100 μ M. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Das Diagramm in Abbildung 20B zeigt die x-fache Induktion von CXCR4 im Vergleich zur Kontrolle sowie die Standardabweichung zwischen den unterschiedlichen Experimenten. Die Abbildung 20B zeigt, dass die CXCR4-Expression in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-B-Zellen signifikant erniedrigt ist. Die Inaktivierung von RelB bzw. IKK1 in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führt zu einer signifikanten Erhöhung der CXCR4-Expression auf Kontrollniveau. Die Expression weiterer Marker, die für die Lokalisation der MZ-B-Zellen wichtig sind, wie CXCR5 und S1PR-1, zeigten in den verschiedenen Genotypen keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erniedrigte CXCR4-Expression in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen ein Grund dafür sein könnte, dass sich die MZ-B-Zellen im Follikel befinden und nicht mehr in die Marginalzone wandern können. Zusätzlich scheint die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs die CXCR4-Expression in LMP1/CD40-B-Zellen zu unterdrücken.

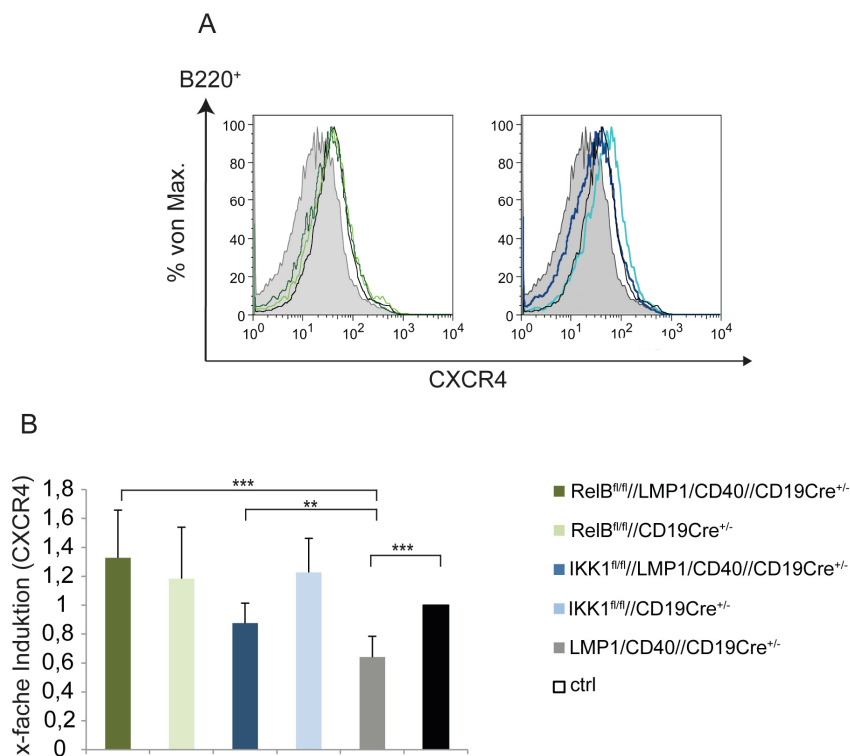


Abbildung 20 Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg unterdrückt die CXCR4-Expression auf den B-Zellen. Lymphozyten der Milz wurden im Durchflusszytometer auf die Expression von CXCR4 untersucht. **(A)** Das Histogramm zeigt eine Überlagerung der Expressionsstärke von CXCR4 von B220⁺-Zellen der genannten Genotypen. LMP1/CD40 (grau ausgefüllt), RelB//LMP1/CD40 (dunkelgrüne Linie), IKK1//LMP1/CD40 (dunkelblaue Linie), RelB-Knockout (hellgrüne Linie), IKK1-Knockout (hellblaue Linie), Kontrolle (schwarze Linie). **(B)** Gezeigt ist die x-fache Induktion von CXCR4 im Vergleich zur Kontrolle. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. ** P < 0,01, *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test. n=4-7.

3.1.7 Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs ist für die B-Zell-Akkumulation in den Lymphknoten der LMP1/CD40-Mäuse verantwortlich

Da bekannt war, dass LMP1/CD40-Mäuse vermehrt B-Zellen in den Lymphknoten im Vergleich zu Kontrollmäusen haben, sollte untersucht werden, ob diese B-Zell-Akkumulation auch noch nach Inaktivierung von RelB oder IKK1 nachweisbar ist. Die Lymphknoten-Zellen der verschiedenen Genotypen wurden mit Antikörpern gegen B220, IgM und IgD gefärbt und anschließend durch Durchflusszytometrieanalyse untersucht.

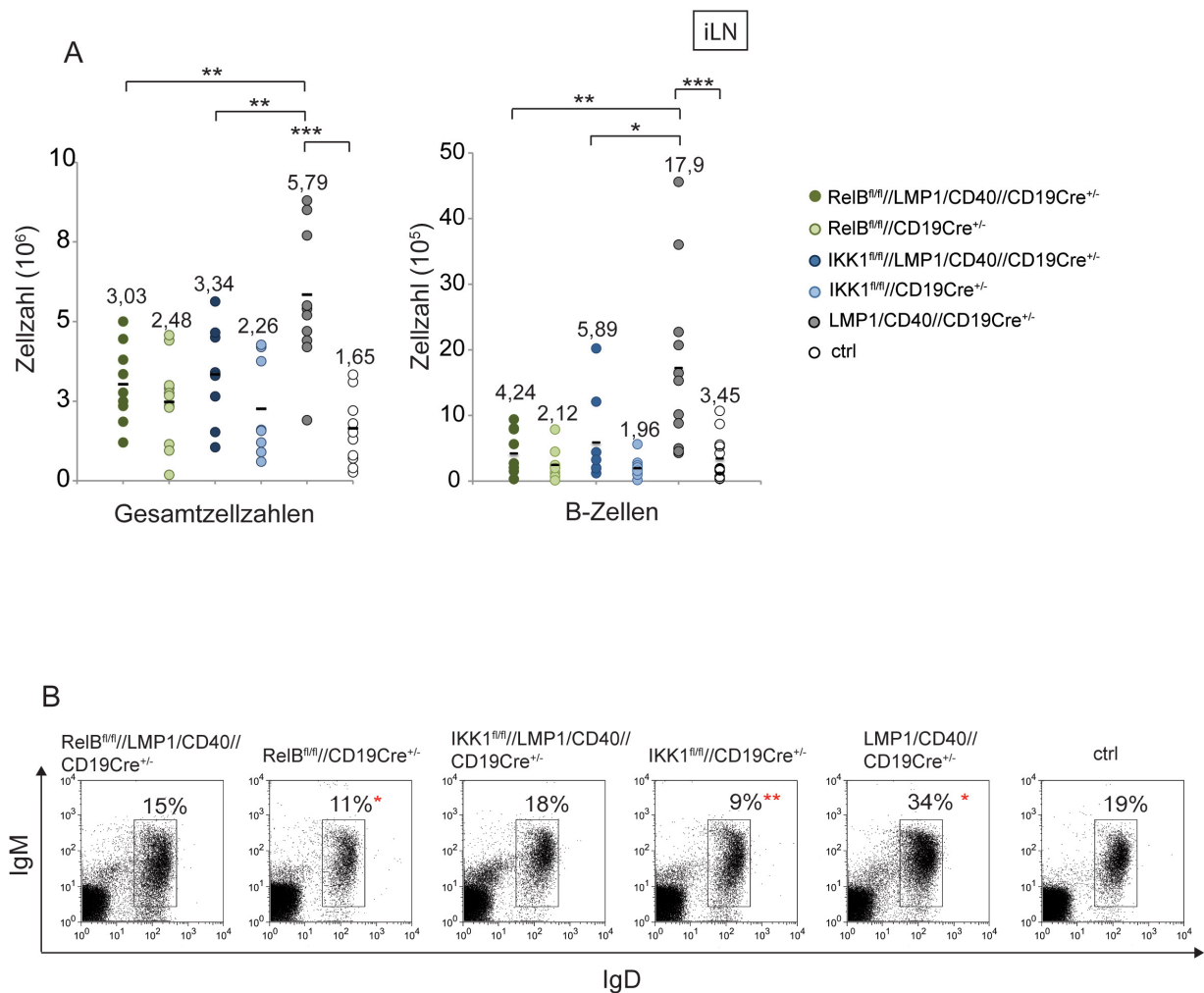


Abbildung 21 Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg spielt bei der B-Zell-Akkumulation in den Lymphknoten der LMP1/CD40-Mäuse eine Rolle. (A) Dargestellt sind die Gesamt- und B-Zellzahlen in den Lymphknoten der genannten Genotypen. Durchschnittswerte sind durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. **(B)** Gezeigt ist eine repräsentative FACS-Analyse der IgM/IgD⁺-Zellen. Der FACS-Plot bezieht sich auf B220⁺-Lymphozyten. Die Prozentzahlen zeigen die folliculären B-Zellen im Lymphknoten. * P < 0,05, ** P < 0,01 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Mäusen; n=8-13.

Die Gesamtzellzahlen und die B-Zellzahlen im Lymphknoten der transgenen LMP1/CD40-Mäuse waren im Vergleich zu Kontrollmäusen erhöht (Abbildung 21A). Die Deletion von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führte im Lymphknoten zu einer Abnahme sowohl der Gesamtzellzahlen als auch der B-Zellzahlen.

Die Durchflusszytometrieanalyse zeigt den prozentualen Anteil der IgM/IgD-positiven Zellen im Lymphknoten (Abbildung 21B). Die Lymphknoten der transgenen LMP1/CD40-Mäuse enthielten 34% IgD-positive Zellen, während in denen der Kontrollmäuse nur 19% aufzufinden waren. Nach Inaktivierung von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen waren die IgD-positiven Zellen auf Kontrollniveau reduziert. Auch waren die IgD-positiven Zellen in den Einzelknockouts (RelB- und IKK1-Knockout-Mäuse) im Vergleich zu Kontrollmäusen erniedrigt. Dies deutet darauf hin, dass über die Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs die Wanderung bzw. Retention der B-Zellen im Lymphknoten beeinflusst wird.

3.1.8 Die Reduktion der B1-Zellen in der Peritonealhöhle von transgenen LMP1/CD40-Mäusen kann durch die Deletion von RelB und IKK1 aufgehoben werden

B1-Zellen befinden sich zum größten Teil im Peritoneum, wobei auch sehr wenige in der Milz aufzufinden sind (Martin and Kearney, 2001). B1-Zellen werden an Hand ihrer CD5-Expression in B1a- und B1b-Zellen unterteilt (Baumgarth, 2011). C. Hömig-Hölzel konnte in ihrer Doktorarbeit bereits zeigen, dass die B1a und B1b-Zellen in der Peritonealhöhle der transgenen LMP1/CD40-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen erniedrigt waren.

Um herauszufinden, ob die Reduktion der B1a und B1b-Zellen durch eine verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs verursacht wird, wurden Zellen aus der Peritonealhöhle von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40-Mäusen sowie der Kontroll- und Einzelknockout-Mäusen isoliert und die Gesamtzellzahlen und Lymphozytenzahlen bestimmt (Abbildung 22). Außerdem wurden die Zellen angesichts ihrer B220- und CD5-Expression auf die prozentualen Verhältnisse von B1a, B1b und B2-Zellen analysiert (Abbildung 23).

Die Gesamtzellzahlen in der Peritonealhöhle der transgenen LMP1/CD40-Mäusen waren im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant und die Lymphozytenzellzahlen tendenziell erniedrigt (Abbildung 22 und Tabelle 5). Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führte in diesen Mäusen im Vergleich zu LMP1/CD40-Mäusen zu einem deutlichen Anstieg der Gesamt- und Lymphozyten-

zellzahlen. Die Gesamt- und Lymphozytenzellzahlen der RelB-Knockout-Mäuse waren vergleichbar zu denen in Kontrollmäusen. In den IKK1-Knockout-Mäusen waren dagegen signifikant mehr Gesamt- und Lymphozytenzellzahlen im Vergleich zu Kontrollmäusen vorhanden (Abbildung 22 und Tabelle 5).

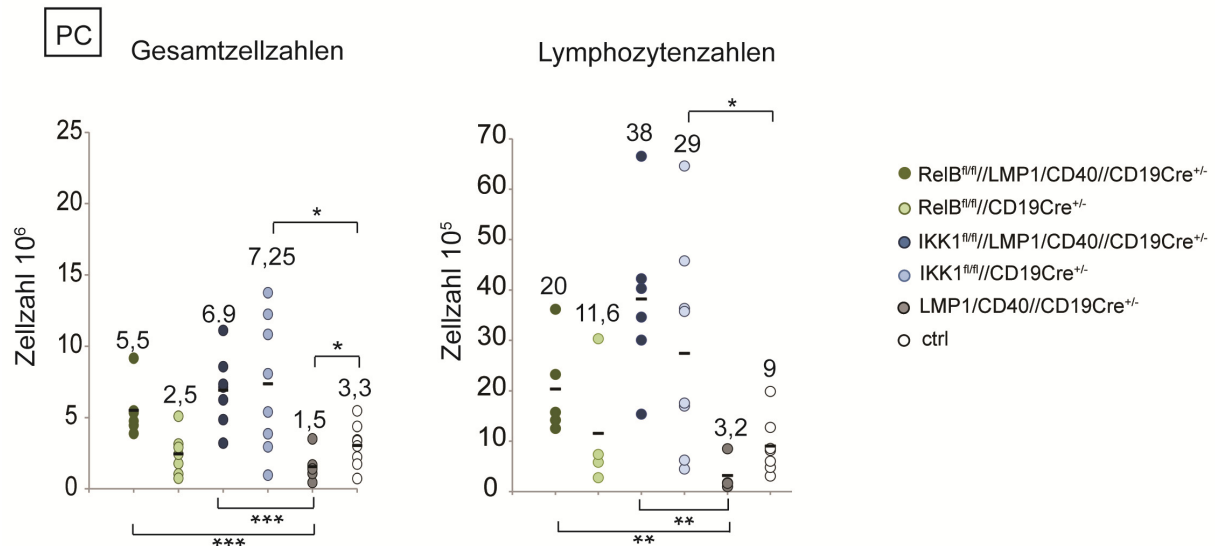


Abbildung 22 Nach Deletion von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-B-Zellen gelangen wieder mehr Zellen in die Peritonealhöhle. Gezeigt sind die Gesamt- und Lymphozytenzellzahlen in der Peritonealhöhle der genannten Genotypen. Die Zellen wurden im FACS analysiert und an Hand der Zellgröße und Granularität die prozentualen Anteile der Lymphozyten bestimmt. Der schwarze Balken gibt den Durchschnittswert an. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; $n=5-9$.

Um B1a-, B1b- und B2-Zellen in der Peritonealhöhle zu unterscheiden, wurden die Zellen hinsichtlich ihrer B220- und CD5-Expression untersucht (Abbildung 23A). B1a- ($B220^{\text{niedrig}}CD5^+$) und B1b-Zellen ($B220^+CD5^-$) waren in den transgenen LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen (CD19-cre) prozentual erniedrigt (Abbildung 23B). Sowohl die prozentualen Anteile als auch die Zellzahlen der B1a- und B1b-Zellen waren nach RelB oder IKK1 Inaktivierung in LMP1/CD40-B-Zellen auf Kontrollniveau erhöht (Abbildung 23 und Tabelle 5). Dies deutet darauf hin, dass die Hyperaktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs für die verminderten B1-Zellzahlen in der Peritonealhöhle der LMP1/CD40-Mäuse verantwortlich ist.

IKK1-Knockout-Mäuse hatten vermehrt B1b- und B2-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen (Tabelle 5). Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs einen Einfluss auf die Anzahl der B1a-Zellen im Peritoneum hat. Allerdings sah man nach RelB-Inaktivierung diesen Effekt nicht.

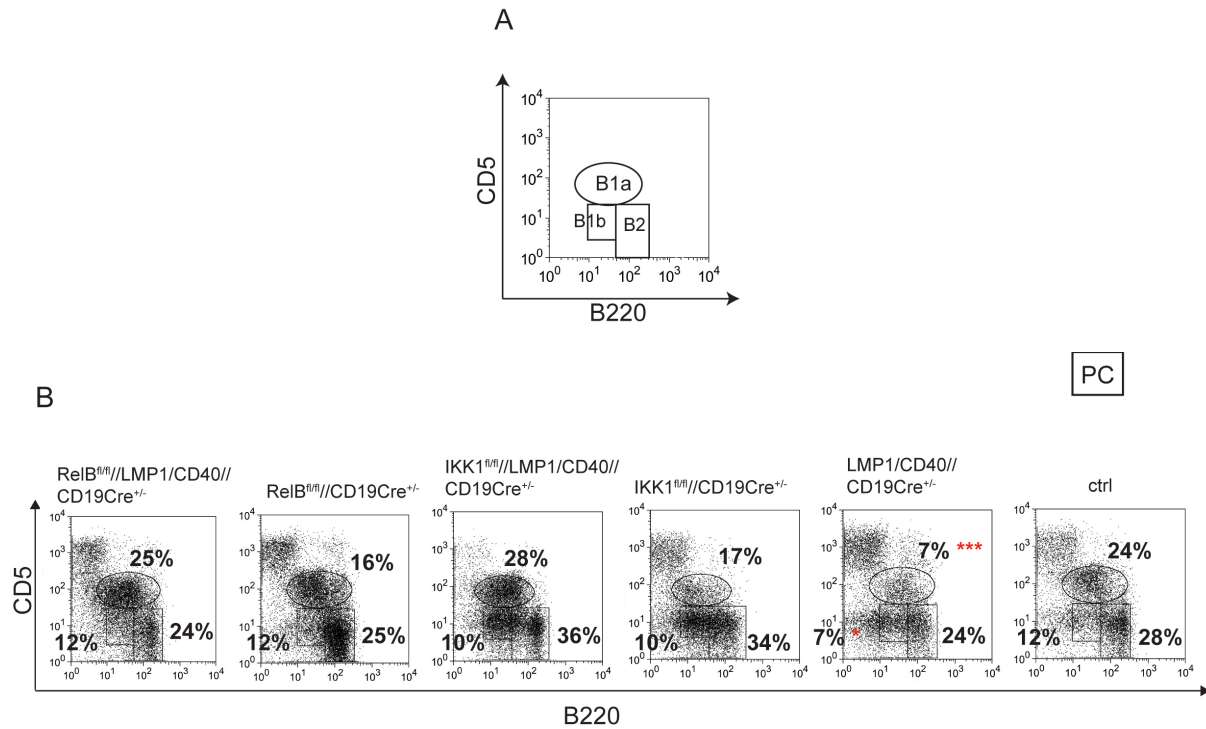


Abbildung 23 Der konstitutiv aktive nicht kanonische NF- κ B Signalweg ist für die erniedrigten B1a- und B1b-Zellen in den LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich. (A) Gezeigt ist eine schematische Darstellung wie B1a- (B220^{niedrig}CD5⁺), B1b- (B220^{hoch}CD5⁻) und B2-Zellen (B220^{hoch}CD5⁺) im FACS bestimmt werden. **(B)** Die Lymphozyten in der Peritonealhöhle der genannten Genotypen wurden mit α -CD5 und α -B220 gefärbt, um die unterschiedlichen B-Zell-Populationen zu unterscheiden. Gezeigt ist eine repräsentative Durchflusszytometrieanalyse. * P < 0,05, *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Mäusen. n=5-9.

Tabelle 5 Prozentualer Anteil und Zellzahlen der B-Zell-Populationen in der Peritonealhöhle. Zellen aus der Peritonealhöhle der genannten Genotypen wurden mit α -B220 und α -CD5 gefärbt, um B1a-Zellen (B220^{low}CD5⁺), B1b-Zellen (B220^{low}CD5⁻) und B2-Zellen (B220^{high}CD5⁺) zu untersuchen. * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); * = Vergleich mit LMP1/CD40-Mäusen. * P < 0,05, ** P < 0,01 *** P < 0,001; berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; n=5-9.

B-Zellpopulation in der Peritonealhöhle			PC (n=5-9)		
	gesamt	Lymphozyten	B1a B220niedrig CD5 ⁺	B1b B220niedrig CD5 ⁻	B2 B220+ CD5 ⁻
(%)					
RelB ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}		45±11,7**	25±7***	13±4*	24±4,2
RelB ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}		24±7,5	16±6,5	11,6±4	25±10
IKK1 ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}		48±11***	27±9***	10±3,3	36±8*
IKK1 ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}		29±5	16±9	9,5±3,7	34±19
LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}		15,5±8*	7,1±4,1***	6,9±3,7*	24±9
CD19Cre ^{+/-}		28±7,6	24±7,3	11,6±3,2	27±10
[x10 ⁵]					
RelB ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	55±18***	20±9,7**	3,4±3,6	2,6±1,6***	5,3±2,7
RelB ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	25±14	11,6±12	0,9±0,8	0,7±0,4	1,6±1,3
IKK1 ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	69±25***	38±17**	11±7,3*	42±29*	13±9**
IKK1 ^{fl/fl} // CD19Cre ^{+/-}	72±46*	29±20*	3,2±2,4	2,4±1,6**	13±12*
LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	15±11*	3,2±3,5	0,39±0,43*	0,17±0,19*	1,0±3
CD19Cre ^{+/-}	30±15	9±5,7	2,4±1,8	0,93±0,69	1,6±1,0

3.1.9 RelB ist für das verbesserte Überleben von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in vitro nicht notwendig

LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen zeigen in vitro ein verbessertes Überleben und eine verstärkte Proliferation (Homig-Holzel et al., 2008). Um zu untersuchen, ob das verbesserte Überleben der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen von der Hyperaktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs abhängt, wurden B-Zellen von RelB// LMP1/CD40- oder IKK1// LMP1/CD40-Mäusen in vitro über fünf Tage in Kultur gehalten und mittels einer TOPRO-3 Färbung die Zellzahl und das Überleben ermittelt.

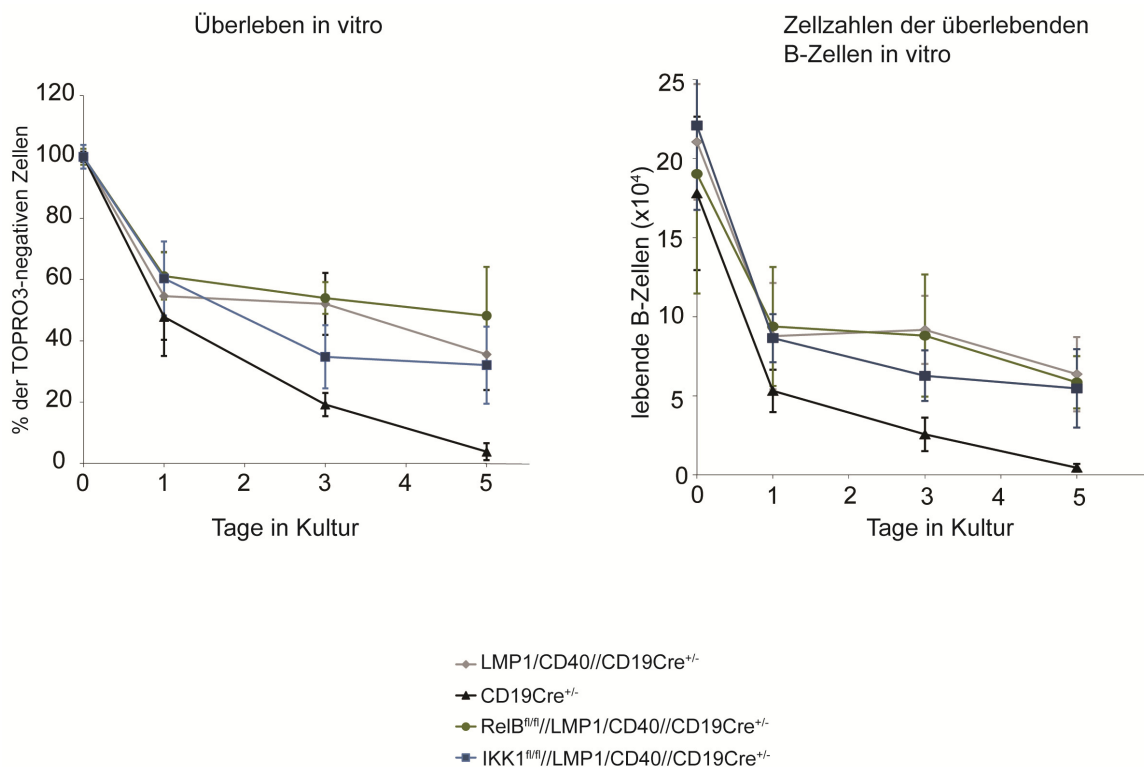


Abbildung 24 RelB ist für das verbesserte Überleben der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen nicht notwendig. B-Zellen der genannten Genotypen wurden für 5 Tage kultiviert. **(A)** Die prozentualen Anteile der lebenden B-Zellen (TOPRO3-negativ) wurden durch FACS-Analyse an Tag 0, 1, 3 und 5 detektiert. An Tag 0 wurden die TOPRO3-negativen B-Zellen auf 100% gesetzt. **(B)** zeigt die Anzahl der lebenden B-Zellen an verschiedenen Tagen der in vitro Kultur. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen. LMP1/CD40 (graue Linie), RelB//LMP1/CD40 (grüne Linie), IKK1//LMP1/CD40 (blaue Linie), Kontrolle (schwarze Linie).

Die Überlebenskurve in Abbildung 24 zeigt, dass im Laufe der Kultur der Prozentsatz der TOPRO3-negativen Zellen von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen höher als in den Kontroll-B-Zellen war. An Tag 5 konnten im Durchschnitt 35% lebende LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen beobachtet werden, wohingegen nur 4% Kontroll-B-Zellen noch vital waren. Dies zeigt, dass LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen gegenüber Kontroll-B-Zellen einen Überlebensvorteil haben. Die Inaktivierung von RelB in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen hatte keinen negativen Einfluss auf das Überleben LMP1/CD40-

exprimierender B-Zellen, wohingegen die Inaktivierung von IKK1 zu einem leicht verschlechterten Überleben der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führte, was aber im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen immer noch deutlich besser war. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verstärkte Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs nur geringfügig zu dem verbesserten Überleben LMP/CD40-exprimierender B-Zellen beiträgt.

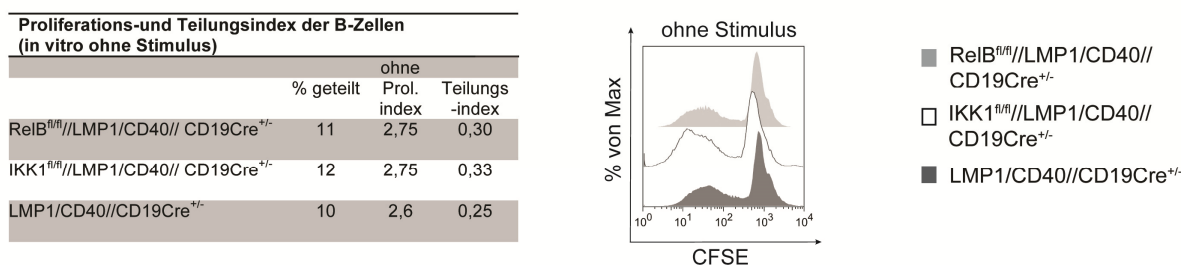
3.1.10 Die Deletion von RelB oder IKK1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in vitro

Um die Frage zu beantworten, ob RelB- oder IKK1-defiziente LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen dasselbe Proliferationsverhalten wie LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen aufweisen, wurden B-Zellen von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40- sowie von LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen in vitro für fünf Tage kultiviert. Um die Proliferation während dieser Zeit zu untersuchen, wurden B-Zellen mit CFDA-SE (Carboxyfluoreszein - Succinimidyl-Ester) angefärbt. CFDA-SE ist ein membranständiger Farbstoff, der nach Abspaltung durch Esterasen in das fluoreszente Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt wird. Bei der Zellteilung wird das CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, wodurch die Tochterzellen dann nur noch halb so stark fluoreszieren.

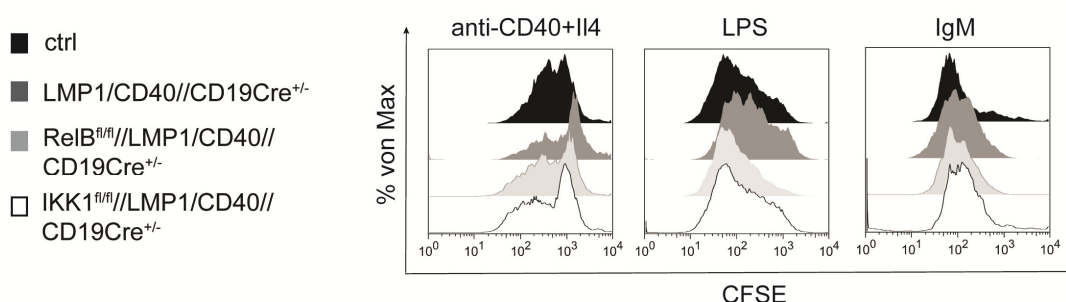
Die Auswertung ergab, dass sich 10% der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen 2,6-mal geteilt haben (Abbildung 25A). Die Inaktivierung von IKK1 oder RelB hatte keinerlei Einfluss auf das Proliferationsverhalten LMP1/CD40-exprimierender B-Zellen. Diese Daten zeigen, dass die durch CD40-Stimulation induzierte Proliferation unabhängig von der Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs ist.

Zusätzlich wurden die B-Zellen der untersuchten Genotypen mit anti-CD40-Antikörpern in Kombination mit IL4, anti-IgM-Antikörpern und LPS untersucht (Abbildung 25B). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Proliferationsrate der B-Zellen von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen festgestellt werden. Damit scheint die Hyperaktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs nicht für die verstärkte Proliferation von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen verantwortlich zu sein.

A



B



Proliferations- und Teilungsindex der B-Zellen (in vitro mit antiCD40+IL-4, LPS und anti-IgM)											
	CD40+IL4				LPS				IgM		
	% geteilt	Prol. index	Teilungsindex		% geteilt	Prol. index	Teilungsindex		% geteilt	Prol. index	Teilungsindex
RelB ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	25,8	1,83	0,47	60,3	1,83	1,11	71,7	1,54	1,1		
IKK1 ^{fl/fl} //LMP1/CD40// CD19Cre ^{+/-}	22,6	1,38	0,31	63,4	2	1,27	84,5	1,83	1,55		
LMP1/CD40//CD19Cre ^{+/-}	17,6	1,7	0,3	61,1	1,84	1,13	76	1,51	1,15		
CD19Cre ^{+/-}	25,3	1,8	0,45	60,7	2,13	1,29	70,2	1,79	1,25		

Abbildung 25 Die Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs ist für die LMP1/CD40-induzierte Proliferation der B-Zellen nicht verantwortlich. (A) B-Zellen der LMP1/CD40-, RelB//LMP1/CD40- und IKK1//LMP1/CD40-Mäuse wurden mit CFSE gefärbt und 4 Tage ohne Stimulus in Kultur gehalten. **(B)** CFSE-gefärbte B-Zellen der genannten Genotypen wurden mit verschiedenen Stimuli (α CD40 + IL4, α IgM, LPS) für 4 Tage kultiviert. Das Proliferations-Profil wurde mittels Durchflusszytometrieanalysen ermittelt und ist als repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.1.11 RelB- und IKK1-defiziente LMP1/CD40-B-Zellen können in vitro nach Stimulation zum IgG1-Isotyp wechseln

Das CD40-Signal ist nicht nur für das Überleben und die Proliferation der B-Zellen wichtig, sondern auch für die Induktion des Klassenwechsels zu IgG1 in Kombination mit IL-4. LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen sind in der Lage in vitro nach IL-4- oder anti-CD40 plus IL4-Stimulation zum IgG1-Isotyp zu wechseln (Homig-Holzel et al., 2008). Um herauszufinden, ob die Inaktivierung von IKK1 bzw. RelB einen Einfluss auf den Klassenwechsel hat, wurden B-Zellen der RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40- und Kontroll-Mäuse isoliert und für 4 Tage mit anti-CD40 und anti-CD40

plus IL4-Stimulation in Kultur gehalten (Abbildung 26). An Tag 4 wurden die Zellen auf IgG1-positive Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Abbildung 26 zeigt, dass der IgG1-Klassenwechsel durch die Abwesenheit von RelB oder IKK1 nicht negativ beeinflusst wurde. Alle Genotypen zeigten einen vergleichbaren prozentualen Anteil an IgG1-positiven Zellen.

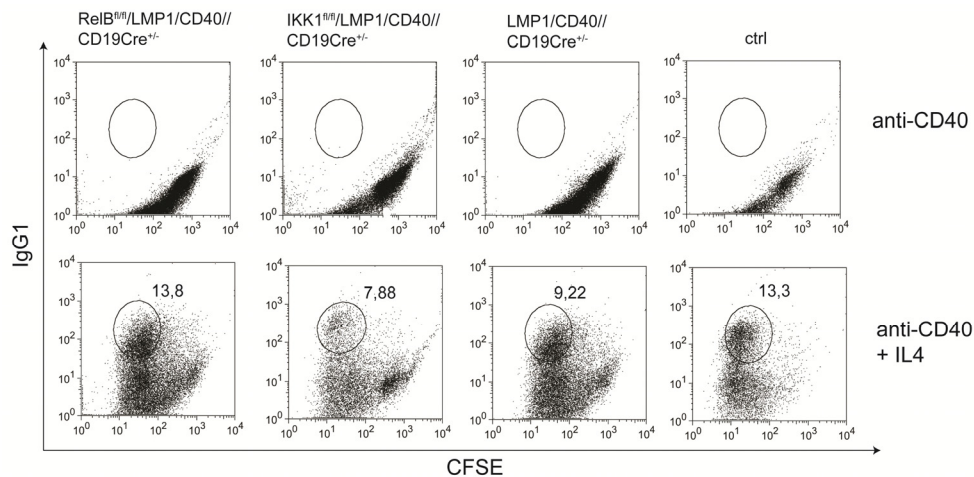


Abbildung 26 RelB- und IKK1-defiziente LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen können *in vitro* nach Stimulation zum IgG1-Isotyp wechseln. Die B-Zellen der genannten Genotypen wurden für 5 Tage mit α -CD40 und α -CD40 plus IL-4 kultiviert. Anschließend wurde die IgG1-Expression auf der Oberfläche mittels eines Durchflusszytometers untersucht. Gezeigt sind Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.12 Die verstärkte Expression von CD95 und ICAM1 wird in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen teilweise über die Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs reguliert

Das konstitutive CD40-Signal in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führt zu einer verstärkten Expression der Aktivierungsmarker CD95 und ICAM1 auf der Oberfläche (Homig-Holzel et al., 2008). Um herauszufinden, in wieweit diese Oberflächenmoleküle über die Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs reguliert werden, wurde die Expressionsstärke dieser Proteine auf den B-Zellen von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40- sowie Kontroll- und Einzelknockout-Mäusen überprüft.

Die Einzelknockout-Mäuse waren bezüglich der CD95- und ICAM1-Expression mit den Kontrollmäusen vergleichbar (Abbildung 27). Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führte zu einer intermediären Expressionsstärke von CD95 zwischen LMP1/CD40- und Kontroll-B-Zellen. Die ICAM1-Expression war in den RelB//LMP1/CD40-B-Zellen im Vergleich zu den LMP1/CD40-B-Zellen

unverändert. Die Deletion von IKK1 in den LMP1/CD40-B-Zellen führte zu einer leichten Reduktion der ICAM1-Expression. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der nicht kanonische NF- κ B Signalweg in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen für die CD95-Expression wichtig ist, aber nahezu keine Rolle bei der ICAM-Expression spielt.

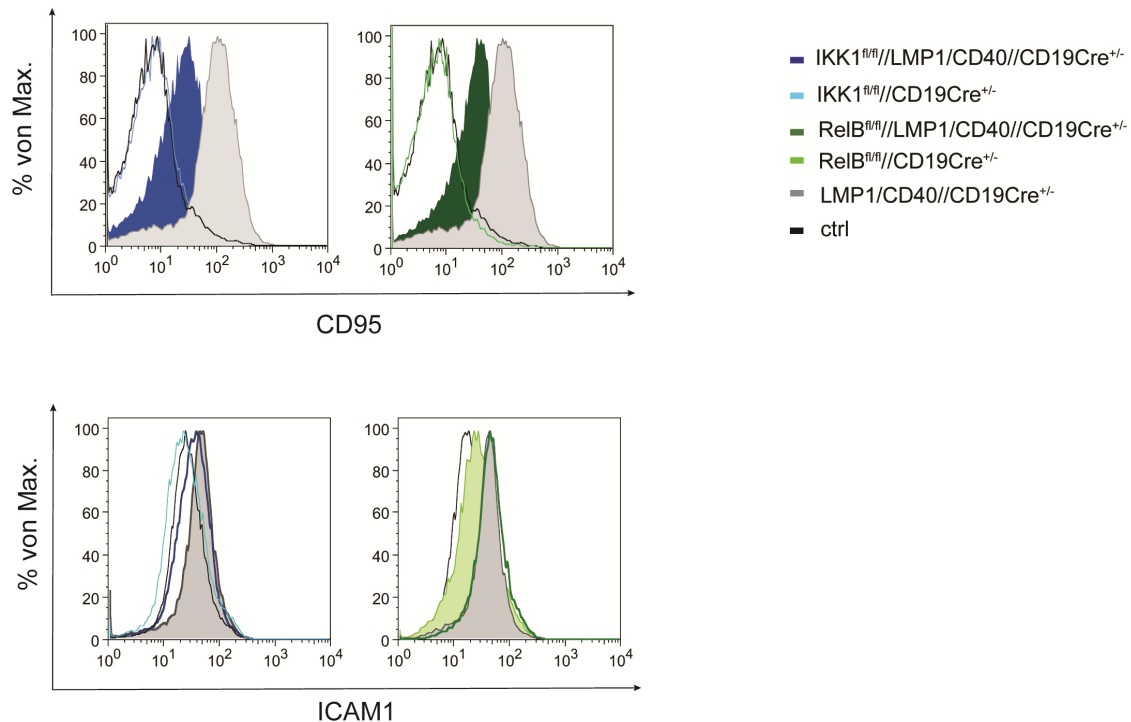


Abbildung 27 RelB und IKK1 spielen eine Rolle bei der Expression von Aktivierungsmarkern in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen. Gezeigt ist die Analyse der Oberflächenexpression von CD95 und ICAM1 auf B220⁺-Lymphozyten, welche mit Hilfe des Durchflusszytometers ausgeführt wurde. Die Histogramme zeigen eine Überlagerung der Expression der genannten Oberflächenmarker. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. LMP1/CD40 (grau ausgefüllt), RelB//LMP1/CD40 (dunkelgrün Linie), IKK1//LMP1/CD40 (dunkelblaue Linie), RelB-Knockout (hellgrüne Linie), IKK1-Knockout (hellblaue Linie), Kontrolle (schwarze Linie).

3.1.13 Die T-Zell-Expansion ist in den RelB- und IKK1-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen unverändert

Die transgenen LMP1/CD40-Mäuse weisen leicht erhöhte T-Zellzahlen auf (Homig-Holzel et al., 2008) (Abbildung 28). Die Deletion von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen zeigte keine Veränderung bezüglich der T-Zellzahlen. Sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen waren ähnlich wie in LMP1/CD40-Mäusen erhöht. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs in B-Zellen nicht zur T-Zell-Expansion in den transgenen LMP1/CD40-Mäusen beiträgt.

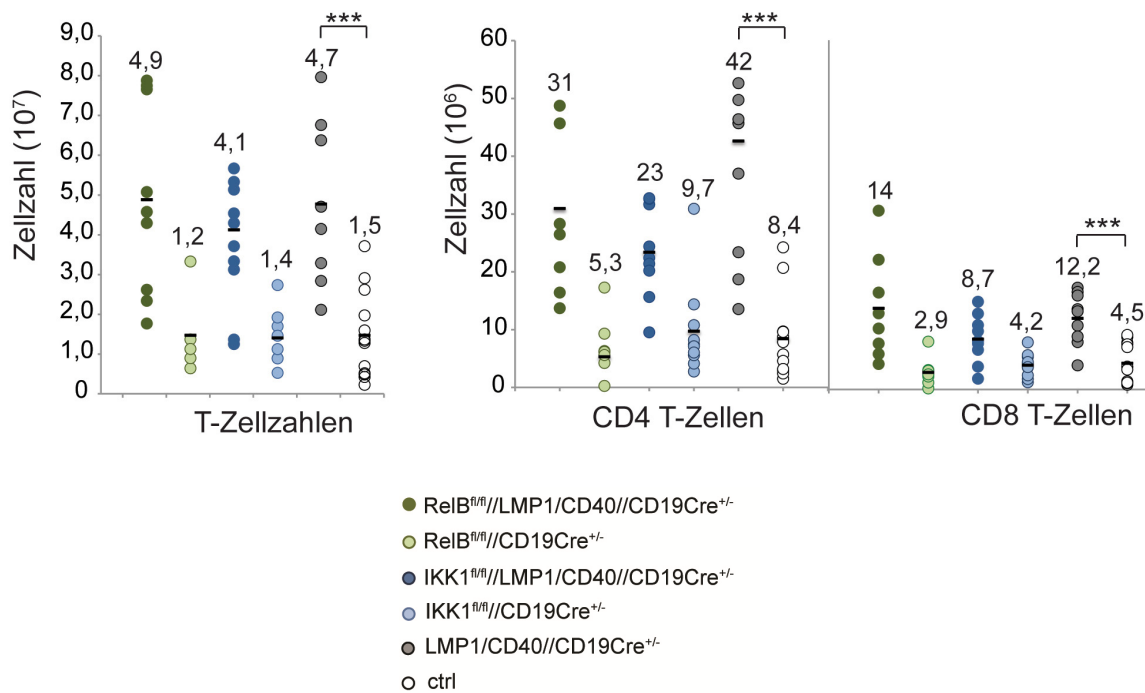


Abbildung 28 Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg spielt keine Rolle für die T-Zell-Expansion in LMP1/CD40-Mäusen. Gezeigt sind die T-Zellzahlen (CD3⁺) sowie die Zellzahlen der Subpopulationen CD4 und CD8 in der Milz. Die prozentualen Anteile wurden mit den Gesamtzellzahlen verrechnet. Der schwarze Balken gibt den Durchschnittswert an. *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test; n=5-13.

3.1.14 Die Deletion von RelB in LMP1/CD40-B-Zellen führt zu einem erhöhten Prozentsatz an T-follikulären Helferzellen.

NIK-Knockout-Mäuse zeigen eine erniedrigte ICOS-L-Expression auf B-Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es zu einer verstärkten ICOS-L-Expression kommt, wenn M16-B-Zellen mit BAFF oder anti-CD40 stimuliert wurden (Hu et al., 2011). Dies führte zu der Annahme, dass der nicht kanonische NF- κ B Signalweg die ICOS-L-Expression induziert. Da in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen der nicht kanonische NF- κ B Signalweg verstärkt aktiviert ist, wurde untersucht, ob deren B-Zellen auch erhöht ICOS-L auf der Zelloberfläche exprimieren.

B-Zellen aus LMP1/CD40- sowie Kontroll-Mäusen wurden isoliert und mittels FACS-Analyse hinsichtlich der ICOS-L-Expression untersucht. Abbildung 29A zeigt, dass die ICOS-L-Expression in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen tatsächlich erhöht ist. Die Deletion von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führte zu einer Reduktion der ICOS-L-Expression (Abbildung 29A und B). Auch die RelB-defizienten B-Zellen wiesen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen eine leicht erniedrigte ICOS-L-Expression auf. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs mehr ICOS-L auf der

Oberfläche der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen exprimiert wird. Das Diagramm in Abbildung 29B zeigt den signifikanten Unterschied der ICOS-L-Expression zwischen den genannten Genotypen.

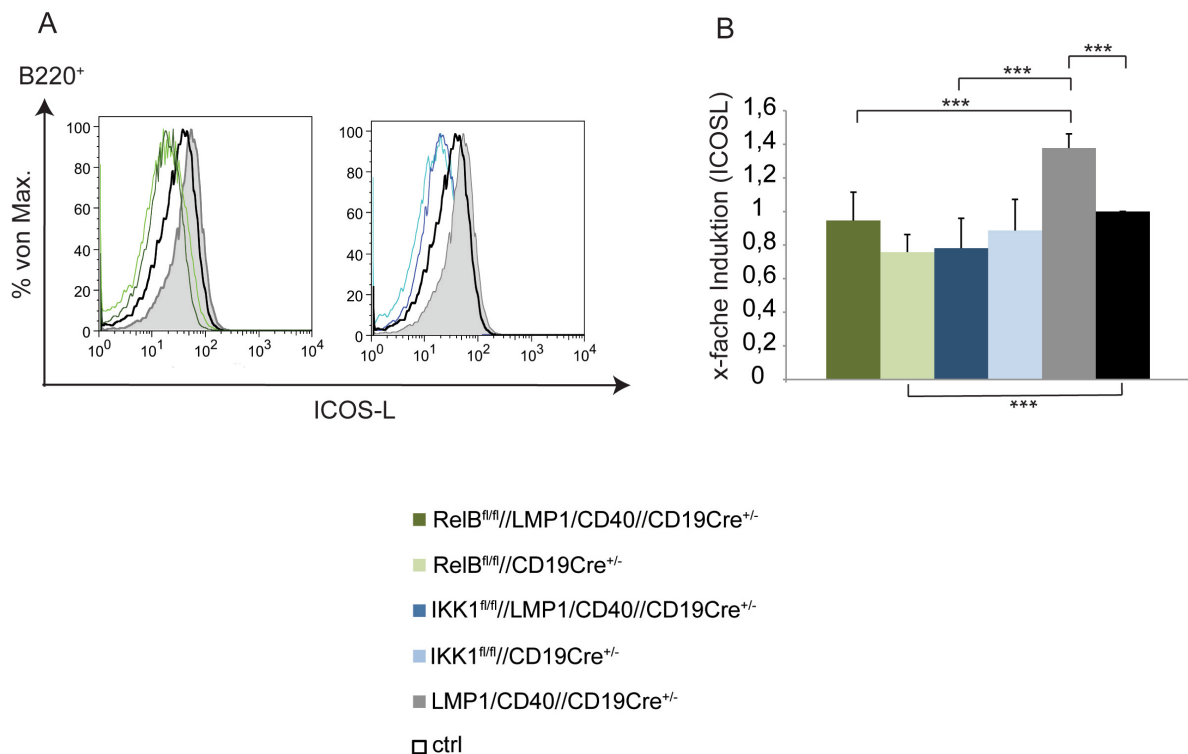


Abbildung 29 Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs führt zu einer erhöhten ICOS-L-Expression in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen. Lymphozyten der Milz wurden im Durchflusszytometer auf die Expression von ICOS-L untersucht. **(A)** Das Histogramm zeigt eine Überlagerung der Expressionsstärke von ICOS-L von B220⁺-Lymphozyten der genannten Genotypen. LMP1/CD40 (grau ausgefüllt), RelB//LMP1/CD40 (dunkelgrüne Linie), IKK1//LMP1/CD40 (dunkelblaue Linie), RelB-Knockout (hellgrüne Linie), IKK1-Knockout (hellblaue Linie), Kontrolle (schwarze Linie). **(B)** Gezeigt ist die x-fache Induktion von ICOS-L im Vergleich zur Kontrolle. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test. n=3-7.

Bei der Untersuchung weiterer Oberflächenmoleküle, die bei der gegenseitigen Kontrolle von B- und T-Zellen eine Rolle spielen, ist uns aufgefallen, dass PD-L1 ähnlich wie ICOS-L reguliert wird. PD-L1 ist ein Molekül, welches bei der Immunantwort reguliert wird und ist unter anderem auf B-Zellen exprimiert. Es ist bekannt, dass bei Abwesenheit vom PD-L1 die Bildung der T-follikulären Helfer-(T_{fh})-Zellen nicht mehr kontrolliert werden kann (Good-Jacobson et al., 2010). Es stellte sich die Frage, ob PD-L1 auf den LMP1/CD40-B-Zellen verstärkt exprimiert ist und somit die Bildung unterdrückt und ob andererseits PD-L1 auf den RelB//LMP1/CD40-B-Zellen runterreguliert ist.

Daher wurde untersucht, ob in den transgenen LMP1/CD40-Mäusen die PD-L1-Expression auf den B-Zellen durch den nicht kanonischen NF- κ B Signalweg induziert

wird. Abbildung 30A zeigt eine erhöhte PD-L1-Expression in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen im Vergleich zu der Kontrolle. Durch die Deletion von RelB oder IKK1 in diesen B-Zellen wurde die PD-L1-Expression signifikant erniedrigt. Die Abbildung 30B zeigt die x-fache Induktion von PD-L1 und bestätigt die signifikanten Unterschiede. Die LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen wiesen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen eine 3-fach erhöhte PD-L1-Expression auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PD-L1 ein weiteres Zielgen des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen ist.

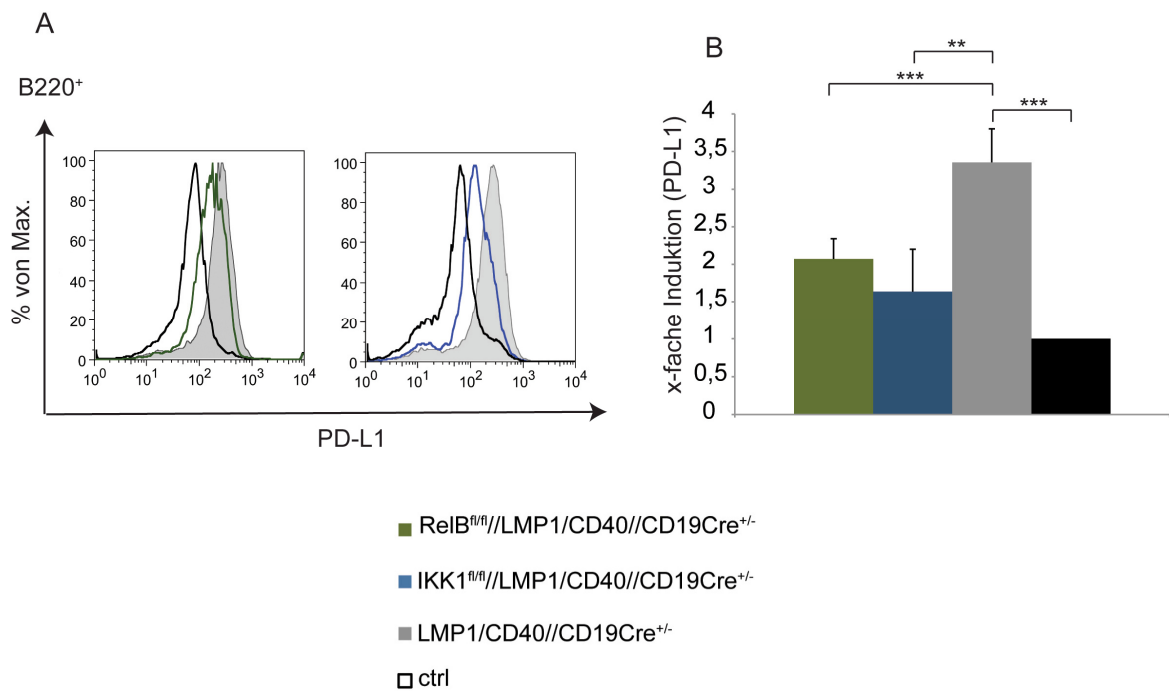


Abbildung 30 Die Expression von PD-L1 in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen ist abhängig von RelB und IKK1. (A) B220⁺-Lymphozyten von RelB^{fl/fl}//LMP1/CD40⁻ (dunkelgrün), IKK1^{fl/fl}//LMP1/CD40⁻ (dunkelblau), LMP1/CD40⁻ (grau), und Kontroll-Mäusen (schwarz) wurden mit α -PD-L1 gefärbt und im Durchflusszytometer auf dessen Expression untersucht. **(B)** Gezeigt ist die x-fache Induktion von PD-L1 im Vergleich zur Kontrolle. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. ** P < 0,01, *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test. n=5.

Die Daten von Hu und seinen Kollegen weisen außerdem darauf hin, dass die erniedrigte ICOS-L-Expression auf B-Zellen von NIK-Knockout-Mäusen einen Defekt in der Bildung von T_H-Zellen auslöst (Hu et al., 2011). Daher kam die Frage auf, ob die kontinuierlich hohe ICOS-L-Expression auf LMP1/CD40-B-Zellen zur spontanen Bildung von T_H-Zellen führt und ob nach Inaktivierung von RelB und IKK1 die T_H-Zell-Bildung aufgehoben ist.

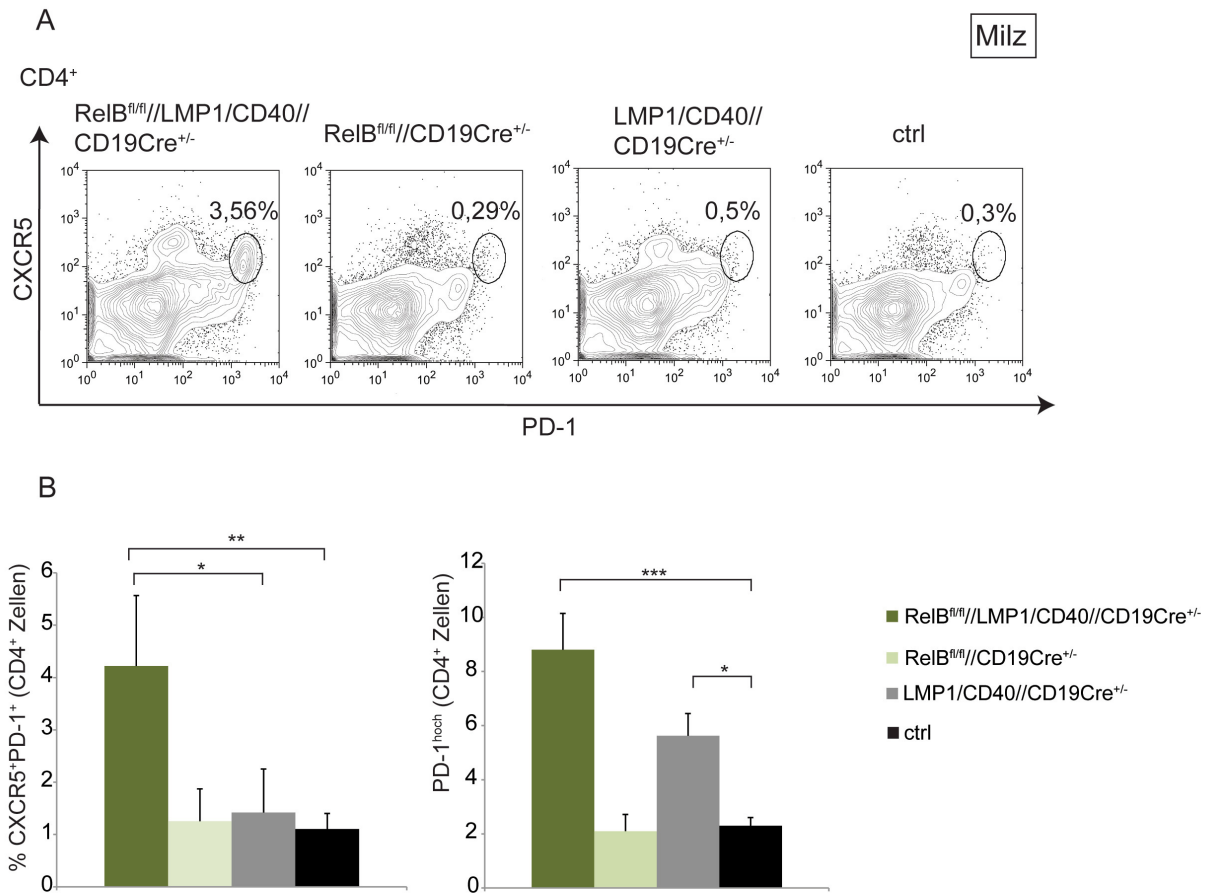


Abbildung 31 Die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen hat eine Erhöhung des prozentualen Anteils von T_H-Zellen zur Folge. (A) Die Milzzellen von RelB^{fl/fl}//LMP1/CD40-, LMP1/CD40-, RelB-Knockout- und Kontroll-Mäusen wurden mit α-CD4, α-CXCR5 und α-PD1 gefärbt, um die T_H-Zellen im Durchflusszytometer zu detektieren. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis. Der FACS-Plot bezieht sich auf CD4⁺-Lymphozyten. **(B)** Die Diagramme zeigen die prozentualen Anteile von T_H-Zellen (links) und PD-1-positiven Zellen (rechts). LMP1/CD40 (graue), RelB^{fl/fl}//LMP1/CD40, (dunkelgrün) RelB-Knockout (hellgrün) und Kontrolle (schwarz). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,01 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test, n=4-5.

Um diese Frage zu beantworten wurde die Bildung von T_H-Zellen in der Milz von den verschiedenen Genotypen untersucht. Milzzellen dieser Genotypen wurden isoliert und mittels CXCR5-, PD1- und CD4-Färbung die prozentualen Anteile der T_H-Zellen untersucht (Abbildung 31A). Im Gegensatz zu den übrigen CD4⁺-T-Zellen sind T_H-Zellen dadurch charakterisiert, dass sie PD1^{hoch} und CXCR5^{hoch} sind. Entgegen unseren Erwartungen führte die erhöhte ICOS-L Expression auf LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen zu keiner spontanen Bildung von T_H-Zellen (Abbildung 31A). Aber erstaunlicherweise führte die RelB-Inaktivierung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen zu einem erhöhten prozentualen Anteil an T_H-Zellen (4,22%) im Vergleich zu Kontrollmäusen (1,1%). In den LMP1/CD40- und RelB-Knockout-Mäusen waren, wie in

den Kontrollmäusen keine spontane Bildung von T_{fh}-Zellen zu beobachten. Die IKK1//LMP1/CD40- und IKK1-Knockout-Mäuse wurden ebenfalls untersucht. Diese hatten keine Erhöhung der prozentualen Anteile der T_{fh}-Zellen (Daten nicht gezeigt). Auffällig war auch die verstärkte PD-1 Expression auf den CD4⁺-T-Zellen der RelB//LMP1/CD40- und LMP1/CD40-Mäusen (Abbildung 31B).

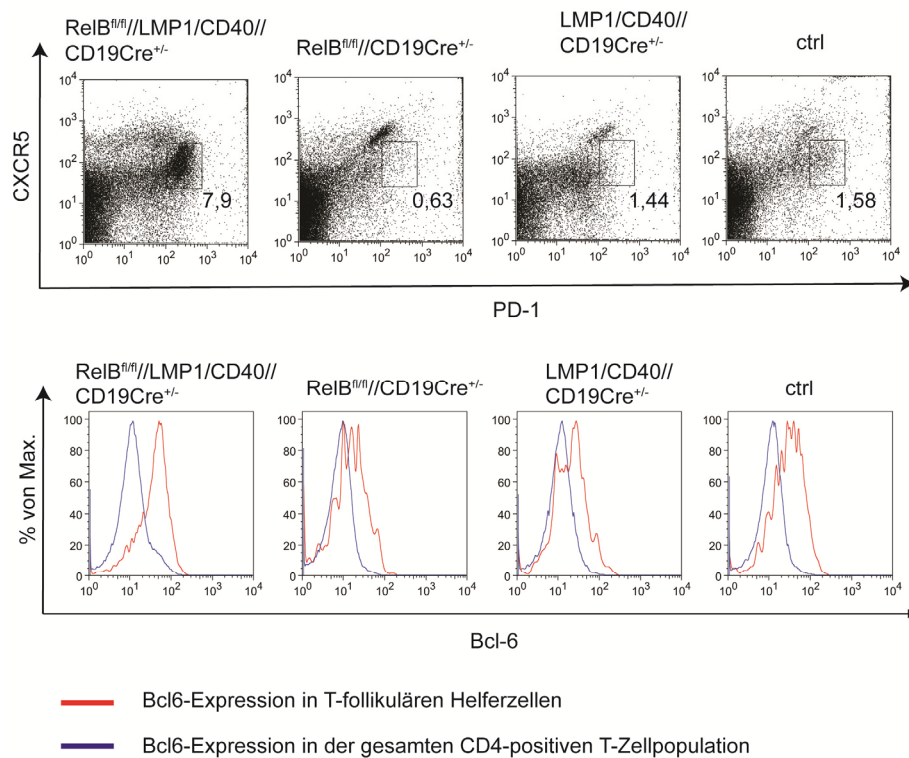


Abbildung 32 Die vermehrt vorhandenen T_{fh}-Zellen in den RelB/LMP1/CD40-Mäusen exprimieren den Transkriptionsfaktor Bcl-6. Milzzellen von LMP1/CD40-, RelB//LMP1/CD40-, RelB-Knockout- und Kontroll-Mäusen wurden mit αCD4, αCXCR5 und αPD-1 gefärbt, um die T_{fh}-Zellen zu untersuchen. Der FACS-Plot bezieht sich auf CD4⁺-Lymphozyten. Im unteren Abschnitt ist eine intrazelluläre Durchflusszytometrieanalyse von Bcl-6 gezeigt. Bcl-6-Expression in den T_{fh}-Zellen (rote Linie) im Vergleich zu der Bcl-6-Expression in den gesamten CD4⁺-T-Zellen (blaue Linie).

Um zu untersuchen, ob es sich bei den CD4⁺, CXCR5⁺, PD1⁺-positiven-Zellen in den RelB//LMP1/CD40-Mäusen tatsächlich um T_{fh}-Zellen handelt, wurden Milzzellen der verschiedenen Genotypen isoliert und mittels einer intrazellulären FACS-Färbung untersucht, ob die PD1^{high}CXCR5^{high}-Population, die in LMP1/CD40//RelB-defizienten Mäusen verstärkt auftritt, den Transkriptionsfaktor Bcl-6 exprimiert, was ein weiteres Charakteristikum von T_{fh}-Zellen ist.

In den RelB//LMP1/CD40-Mäusen konnte wiederum ein erhöhter Anteil von T_{fh}-Zellen (7,9%) im Vergleich zu LMP1/CD40- und Kontroll- sowie RelB-Knockout-Mäusen detektiert werden (Abbildung 32). Die Bcl-6-Expression war in den T_{fh}-Zellen (rote Linie)

deutlich höher als in der gesamten CD4⁺-T-Zellpopulation (blaue Linie). Dieses Ergebnis legt nahe, dass es sich bei der PD1^{high}CXCR5^{high}-Population, die in RelB^{fl/fl}/LMP1/CD40-Mäusen spontan auftritt, tatsächlich um die T_{HH}-Zellen handelte.

3.2 Die Rolle des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs in LMP1/CD40-Mäusen bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort

3.2.1 Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs ist nicht für die Abwesenheit der Keimzentren in LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich

LMP1/CD40-Mäuse können nach T-Zell-abhängiger Immunisierung keine Keimzentren ausbilden und sowohl die hoch- als auch niederaffinen Antigen-spezifischen Antikörper sind stark vermindert (Homig-Holzel et al., 2008). Da die transgenen RelB^{fl/fl}/LMP1/CD40-Mäuse spontan erhöhte prozentuale Anteile an T_{HH}-Zellen haben, sollte untersucht werden, ob die Abwesenheit von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen die gestörte Immunantwort der transgenen LMP1/CD40-Mäuse revidieren kann. RelB^{fl/fl}/LMP1/CD40-, IKK1^{fl/fl}/LMP1/CD40- und LMP1/CD40-Mäuse sowie RelB-Knockout-, IKK1-Knockout- und Kontroll-Mäuse wurden mit Hühner-Gammaglobulin-konjugiertem Nitrophenylacetyl (NP-CGG), welches eine T-Zell-abhängige (TD) Immunantwort auslöst, immunisiert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse analysiert. Es wurde die Bildung von Keimzentren in der Milz durch Histologie bestimmt und die Anteile von Keimzenters-B-Zellen (KZ-B) in der Milz mit einer B220, CD95, PNA-Färbung wie in Abbildung 33 gezeigt, im FACS ermittelt.

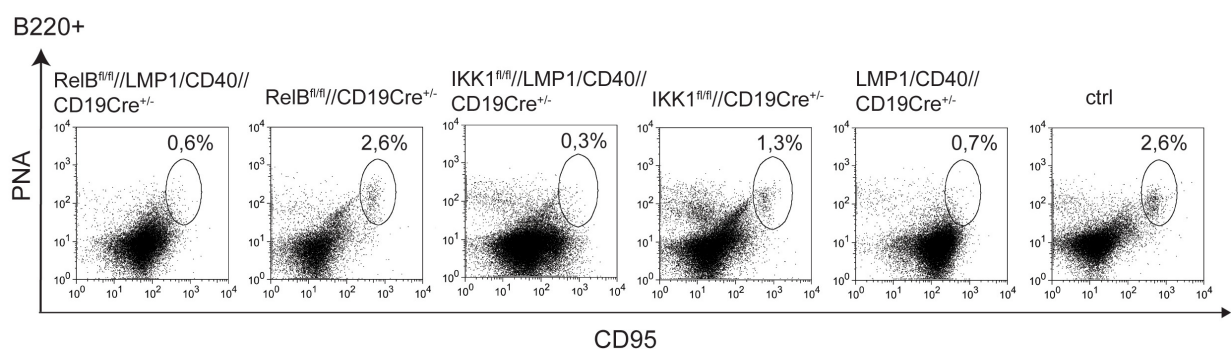


Abbildung 33 Nachweis von Keimzenters-B-Zellen. LMP1/CD40-, RelB^{fl/fl}/LMP1/CD40-, IKK1^{fl/fl}/LMP1/CD40-, RelB-Knockout-, IKK1-Knockout- und Kontroll-Mäuse wurden mit einem T-Zell-abhängigen Antigen (NP-CGG) immunisiert. Nach 14 Tagen wurden die Milzzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrieanalyse auf Keimzenters-B-Zellen (B220⁺PNA⁺CD95⁺) untersucht. Der FACS-Plot bezieht sich auf B220⁺-Lymphozyten. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten. n=5.

Nach Deletion von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen konnten immer noch keine KZB-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 33). In Mäusen mit RelB- bzw. IKK1-defizienten B-Zellen waren die Anteile der KZB-Zellen vergleichbar mit denen von Kontrollmäusen.

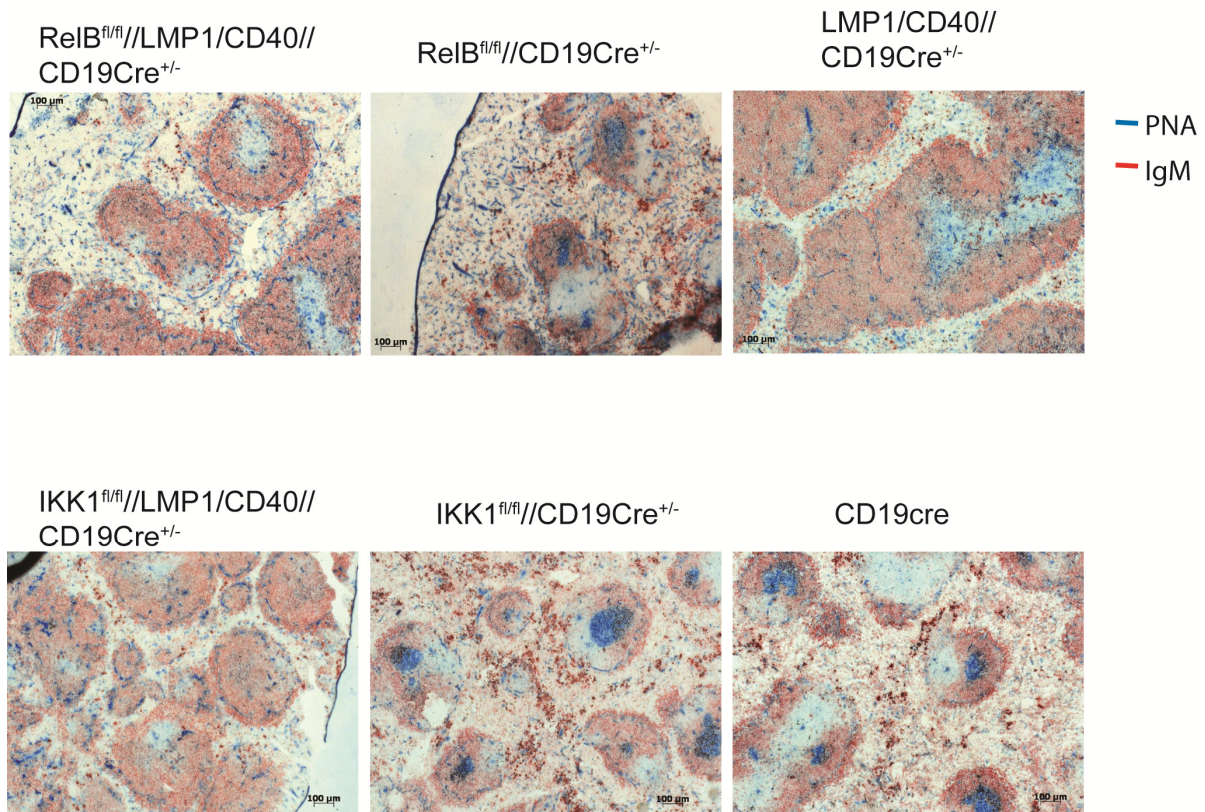


Abbildung 34 Nachweis von Keimzentren durch Immunhistochemie. LMP1/CD40-, RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, RelB-Knockout-, IKK1-Knockout- und Kontroll-Mäuse wurden mit NP-CGG T-Zell-abhängig immunisiert und 14 Tage danach auf Keimzentren untersucht. Hierfür wurden Gefrierschnitte von Milzorganen dieser Mäuse immunhistologisch angefärbt; PNA (Keimzentren; blau) und α -IgM-Antikörper (B-Zellen; rot). Diese Untersuchung wurde mit drei Mäusen pro Genotyp durchgeführt und gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Um die Keimzentrumsbildung und -struktur nachzuweisen, wurden Gefrierschnitte von der Milz angefertigt und mit dem Keimzentrumsmarker PNA (peanut agglutinin) gefärbt (Rose et al, 1980; Rose and Malchiodi, 1981). Die Schnitte wurden zusätzlich mit α -IgM gefärbt, um die Follikelstruktur sichtbar zu machen.

In den Kontroll-, RelB-Knockout- und IKK1-Knockout-Mäusen waren Keimzentren vorhanden, wohingegen sie in den LMP1/CD40-, RelB//LMP1/CD40- und IKK1//LMP1/CD40-Mäusen nicht detektierbar waren (Abbildung 34). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen nicht für die Unterdrückung der

Keimzentrumsreaktion verantwortlich ist. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass RelB- oder IKK1-defiziente B-Zellen Keimzentren ausbilden können.

3.2.2 Die B-zellspezifische Deletion von RelB in LMP1/CD40-Mäusen führt zu einer verstärkten Bildung von IgM und niederaffinen NP-spezifischen IgG1-Antikörpern

Nach einer T-Zell-abhängigen (TD) Immunisierung kommt es vorerst zu einer extrafollikulären Plasmazell-Differenzierung, die zur Bildung von IgM- und niederaffinen IgG1-Antikörpern führt. Im späteren Verlauf der Immunantwort entstehen während der Keimzentrumsreaktion Plasmazellen, die hochaffine Antikörper sezernieren.

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung von RelB oder IKK1 einen Einfluss auf die Antigen-spezifischen Immunglobulintiter in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen hat, wurden 14 Tage nach Immunisierung mit NP-CGG die NP-spezifischen IgG1- und IgM-Titer bestimmt (Abbildung 35). Sowohl die niederaffinen (NP₁₇) als auch die hochaffinen (NP₃) IgG1-Antikörper waren, wie bereits in der Doktorarbeit von Cornelia Hömig-Hölzel beschrieben, im Serum von LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen stark erniedrigt. Die Inaktivierung von IKK1 in LMP1/CD40-B-Zellen hatte keinen Einfluss auf diesen Phänotyp. Jedoch führte die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40-B-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der IgM- und niederaffinen NP-spezifischen IgG1-Antikörper-Konzentrationen auf ein Niveau, das ähnlich zu dem in Kontrollmäusen war. Hingegen waren die hochaffinen IgG1-Antikörper-Mengen in den RelB//LMP1/CD40-Mäusen ebenfalls vergleichbar niedrig wie in LMP1/CD40-Mäusen, was mit der fehlenden Keimzentrumsbildung in Einklang steht. Diese Daten weisen darauf hin, dass in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen durch Inaktivierung von RelB die Unterdrückung der extrafollikulären Immunantwort aufgehoben wird. Da in LMP1/CD40//IKK1-Knockout-Mäusen die RelB-Level im Kern im Vergleich zu den B-Zellen der Kontrollmäuse noch deutlich erhöht sind (siehe Abbildung 8), kann die Repression der extrafollikulären Immunantwort wahrscheinlich nicht aufgehoben werden.

Außerdem wurde untersucht, ob die Deletion von RelB oder IKK1 in B-Zellen an sich einen Einfluss auf die Antikörpertiter nach Immunisierung mit NP-CGG hat. Die NP-spezifischen IgM- und IgG1-Antikörper-Titer der RelB-Knockout-Mäuse waren im Vergleich zu den Kontrollmäusen unverändert. Mäuse mit IKK1-defizienten B-Zellen wiesen eine tendenzielle Reduktion der hochaffinen NP-spezifischen IgG1-Antikörper auf. Wobei hier deutlich zu sehen ist, dass bei drei von vier Mäusen die hochaffinen NP-

spezifischen IgG1-Antikörpertiter stark erniedrigt sind. Die niederaffinen NP-spezifischen IgG1-Antikörpertiter waren im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erniedrig. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Inaktivierung von IKK1 in den B-Zellen einen negativen Einfluss auf die NP-spezifischen IgG1-Antikörpertiter nach TD-Immunisierung hat.

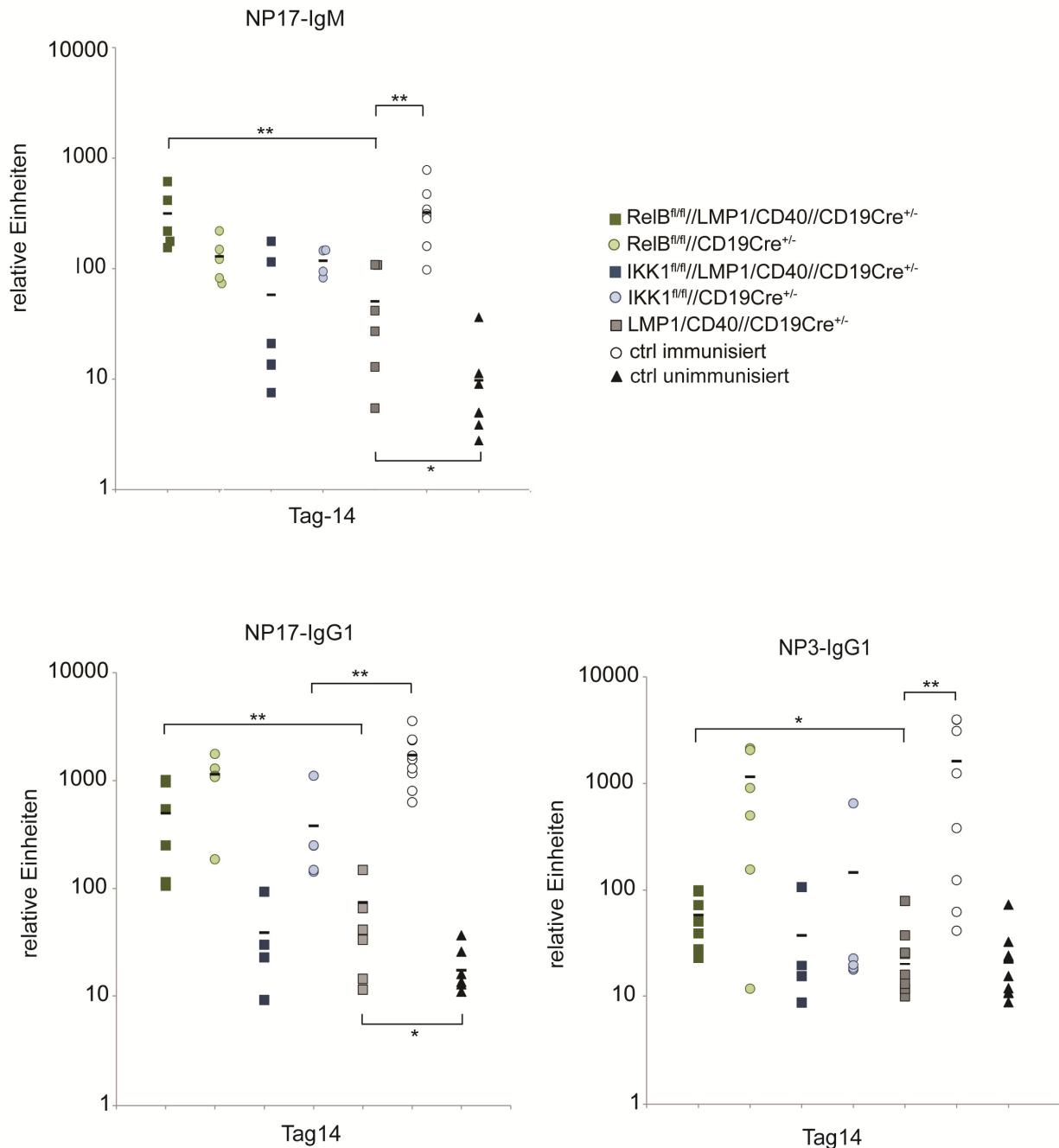


Abbildung 35 Die RelB-Inaktivierung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führt zu einer Erhöhung der IgM- und niederaffinen-IgG1-Antikörpertiter im Serum. Gezeigt sind NP-spezifische Immunglobulintiter der untersuchten Genotypen. Die NP-spezifischen Immunglobulintiter wurden mittels ELISA ermittelt. Es sind NP-spezifische IgG1- und IgM-Antikörper, 14 Tage nach der Immunisierung, dargestellt. * P <0,05, ** P<0,01, *** P <0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test. n=4-7.

3.2.3 Plasmazellbildung nach Immunisierung

Um den Anteil der NP-spezifischen Plasmazellen nach der Immunisierung zu untersuchen, wurde eine Elispot-Analyse durchgeführt. LMP1/CD40-Mäuse hatten signifikant weniger NP-spezifische IgG1-Antikörper-sezernierende Plasmazellen im Knochenmark und in der Milz im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abbildung 36). Die Inaktivierung von IKK1 in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen konnte die Abwesenheit von IgG1-Antikörper-sezernierenden Plasmazellen in der Milz und im Knochenmark in den LMP1/CD40-Mäusen nicht revidieren. Nach Deletion von RelB in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen konnten mehr niederaffine NP-spezifische IgG1 und IgM-Antikörper-sezernierende Plasmazellen in der Milz im Vergleich zu den LMP1/CD40-Mäusen detektiert werden, jedoch wurden bei IgG1 die Kontrolllevel nicht erreicht. Die Analyse der NP-spezifischen-IgM-Antikörper-sezernierenden Plasmazellen ergab, dass die RelB//LMP1/CD40-Mäuse im Knochenmark vergleichbare Mengen wie die Kontrollmäuse hatten und in der Milz sogar erhöhte Mengen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verstärkte RelB-Menge im Kern der LMP1/CD40-B-Zellen eine extrafollikuläre Differenzierung zu NP-spezifischen IgG1- und IgM-sezernierenden Plasmazellen unterdrückt.

Zwischen den IKK1-Knockout-, RelB-Knockout- und Kontroll-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Plasmazellen in der Milz ermittelt werden (Abbildung 36). Die hochaffinen NP-spezifischen IgG1-Antikörper-sezernierenden Plasmazellen im Knochenmark der IKK1-Knockout- und RelB-Knockout-Mäuse waren jedoch im Vergleich zu den Kontrollmäusen erniedrigt. Die Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass der nicht kanonische NF- κ B Signalweg eine Rolle bei der Wanderung der NP-spezifischen IgG1-Antikörper-sezernierenden Plasmazellen aus der Milz in das Knochenmark spielt.

Nach einer T-Zell-abhängigen Immunantwort, kommt es nicht nur zur Plasmazell-Differenzierung, sondern auch zu einer Entwicklung von Gedächtnis-B-Zellen. Gedächtnis-B-Zellen bleiben für eine lange Zeit im Blut und in den sekundären lymphoiden Geweben und können bei erneutem Antigenkontakt zu einer schnellen und hochspezifischen sekundären Immunantwort führen. Die Gedächtnis-B-Zellen (IgG1⁺NP⁺) der LMP1/CD40-Mäuse waren 14 Tage nach Immunisierung im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant erniedrigt (Abbildung 37).

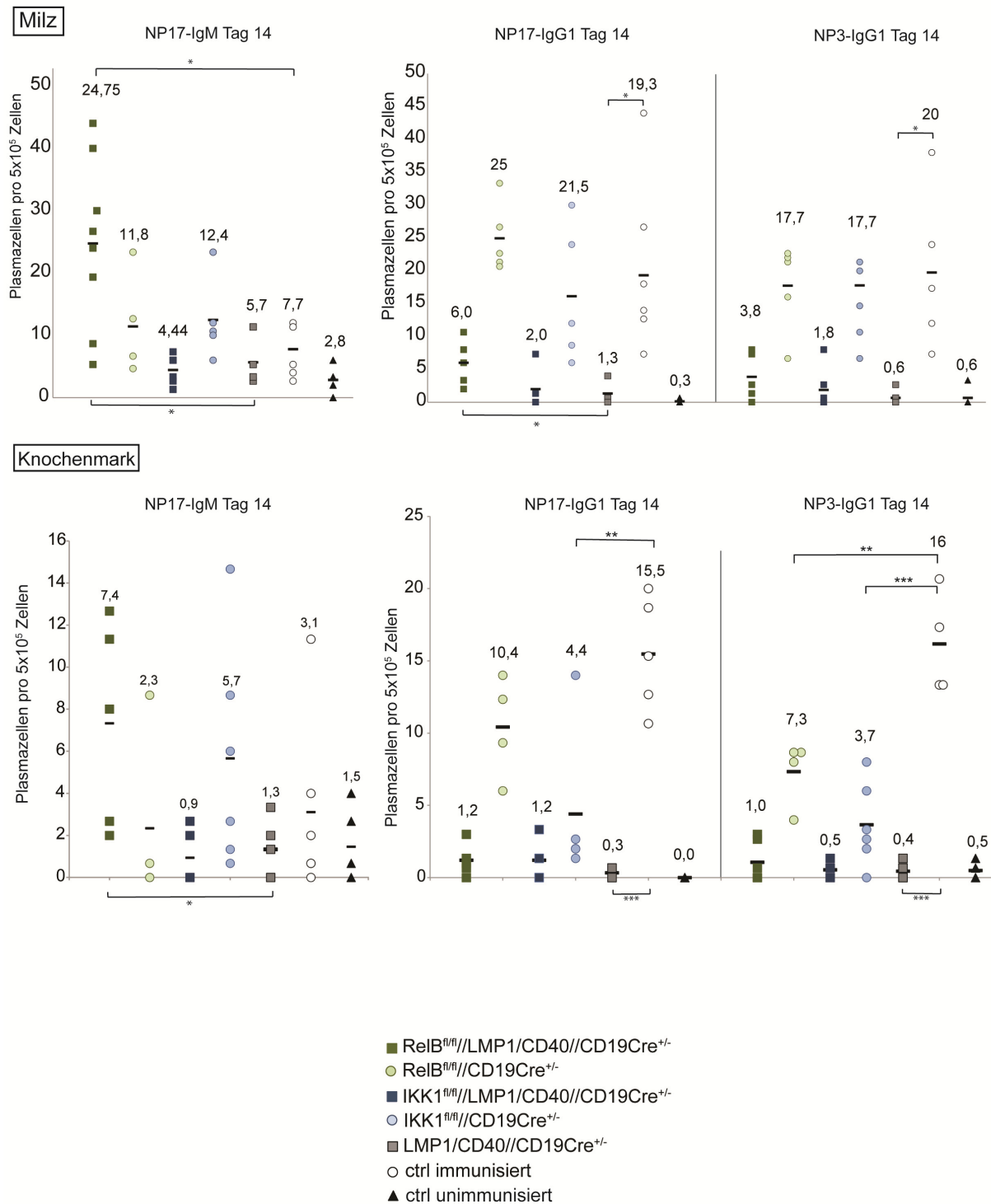


Abbildung 36 RelB//LMP1/CD40-Mäuse haben im Vergleich zu LMP1/CD40-Mäusen nach T-Zell-abhängiger Immunisierung leicht vermehrt IgM- und niederaffine IgG1-sezernierende Plasmazellen. Gezeigt ist eine Elispot-Analyse mit der die Anzahl NP-spezifischer Plasmazellen nachgewiesen werden können. 14 Tage nach TD-Immunisierung wurden die Milzzellen auf Elispotplatten ausplattiert, um die IgG1- und IgM-Antikörper sezernierenden Plasmazellen in der Milz und im Knochenmark zu detektieren. n= 4-8.

Die Deletion von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-B-Zellen hatte keinen Einfluss auf diesen Phänotyp. Dieses Ergebnis war auch zu erwarten, da die LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen keine Keimzentrumsreaktion durchführen konnten. Dieser

Block kann, wie in Abschnitt 3.2.1 gezeigt, durch die Inaktivierung von IKK1 oder RelB nicht aufgehoben werden. Zusammenfassend zeigen diese Versuche (Abschnitte 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3), dass die Inaktivierung von RelB und IKK1 in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen den Block in der Keimzentrumsreaktion nicht revidieren kann. Jedoch scheint die Inaktivierung von RelB die verminderte extrafollikuläre Immunantwort, die in LMP1/CD40-Mäusen zu beobachten ist, zumindest teilweise aufzuheben.

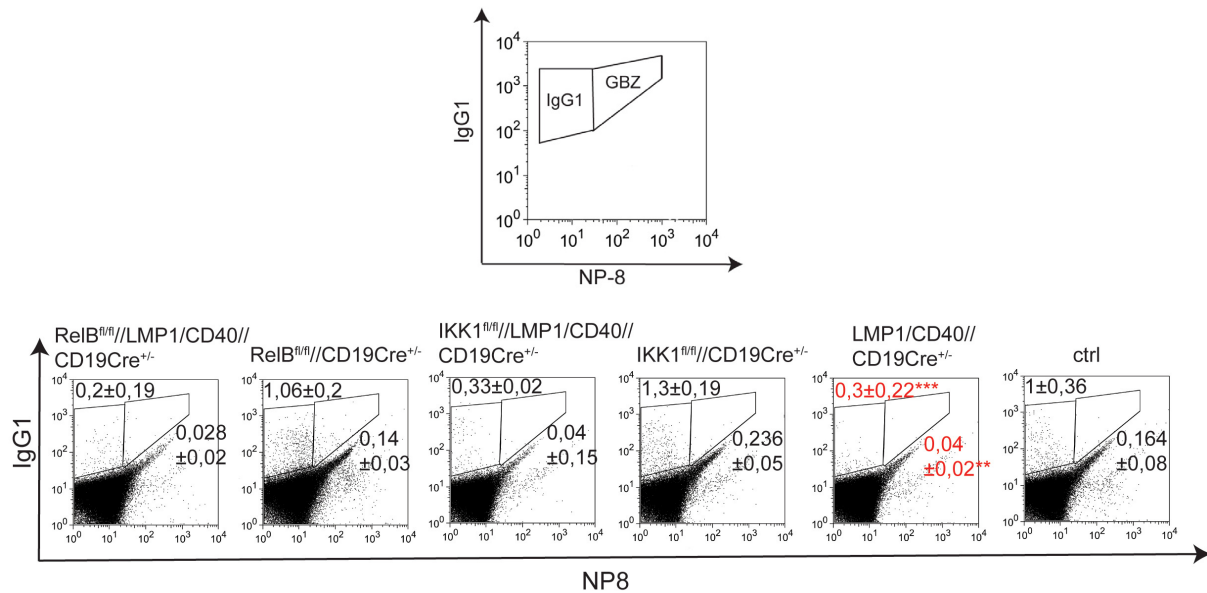


Abbildung 37 Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg ist nicht für die Bildung der Gedächtnis-B-Zellen wichtig. (A) Schematische Darstellung wie Gedächtnis-B-Zellen (GBZ) mit einer IgG1-NP-8-Färbung bestimmt werden. **(B)** Prozentuale Anteile der GBZ (IgG1+NP8+) und IgG1+-Zellen von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40-, RelB-Knockout-, IKK1-Knockout- und Kontroll-Mäusen. Der FACS-Plot bezieht sich auf B220+-Lymphozyten. ** P < 0,01, *** P < 0,001 berechnet mit dem zweiseitigen t-Test. * = Vergleich mit Kontrollmäusen (CD19-cre); n=5.

3.3 Die Inaktivierung von RelB und IKK1 hat keinen Einfluss auf die Aktivität der MAPK Erk und Jnk

Neben der Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs führt die B-zellspezifische Expression von LMP1/CD40 zur Aktivierung der MAPK Jnk und Erk. Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung von RelB bzw. IKK1 einen Einfluss auf die Aktivität der MAPK hat, wurden Proteinextrakte der vier Genotypen (LMP1/CD40, IKK1//LMP1/CD40, RelB//LMP1/CD40 und Kontrolle) mit Hilfe der Western-Blot-Analyse bezüglich des Phosphorylierungs-Status von Erk und Jnk analysiert.

Die Jnk- und Erk-Phosphorylierung war in den B-Zellen der LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40- und RelB//LMP1/CD40-Mäuse vergleichbar und somit im Vergleich

zu den Kontrollmäusen erhöht (Abbildung 38A). Zusätzlich wurde eine Western-Blot-Quantifizierung für pErk durchgeführt, welches die Ergebnisse in Abbildung 38A bestätigt (Abbildung 38B). Dies weist darauf hin, dass in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen die erhöhte Phosphorylierung der MAPK Erk und Jnk unabhängig von der verstärkten Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalweg ist.

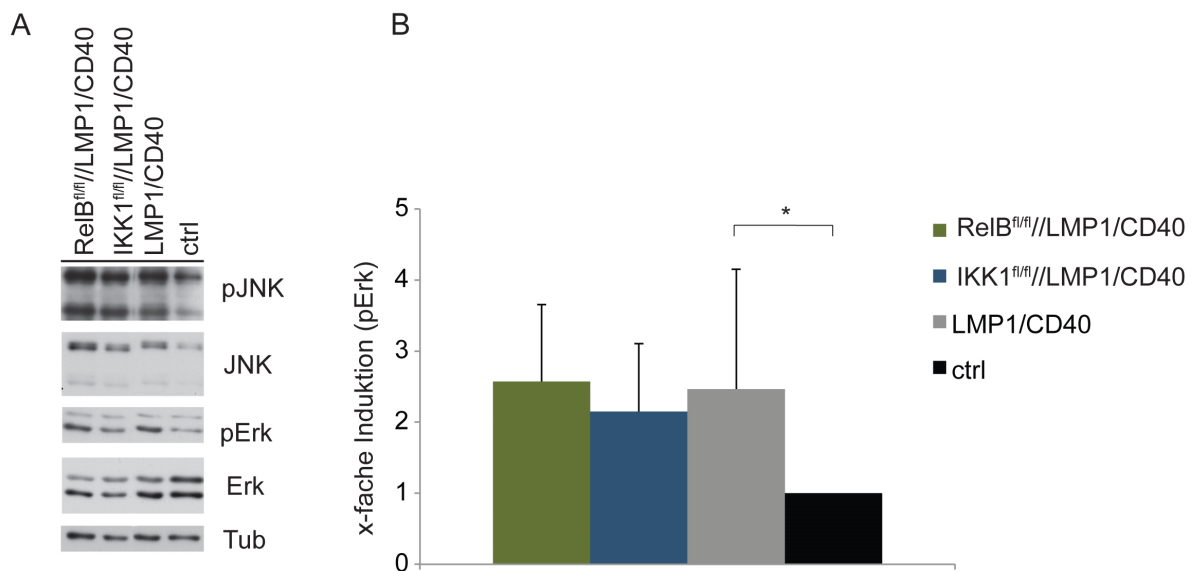


Abbildung 38 Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg spielt keine Rolle in der LMP1/CD40-induzierten Phosphorylierung von Erk. (A) Gesamtproteine der B-Zellen von RelB//LMP1/CD40-, IKK1//LMP1/CD40-, LMP1/CD40- und Kontroll(ctrl)-Mäusen wurden mittels Western-Blot auf Erk, p-Erk, Jnk und p-Jnk untersucht. Tubulin diente hier als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. (B) Die Quantifizierung von p-Erk erfolgte mit dem ImageJ-Programm. Die Kontrolle wurden auf 1 gesetzt. * P < 0,05, berechnet mit dem zweiseitigen t-Test. n=3-7.

3.3.1 Die erhöhte Erk-Phosphorylierung wird in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen über Nemo vermittelt

Im Gegensatz dazu konnte Sabine Schmidl, eine ehemalige Doktorandin unseres Labors, zeigen, dass die Inaktivierung von Nemo, eine Komponente des kanonischen NF- κ B Signalwegs, in den LMP1/CD40-B-Zellen die verstärkte Erk-Phosphorylierung aufhebt und dadurch wahrscheinlich zur verminderten B-Zell-Expansion führt.

Meine Aufgabe war es, die Erk-Phosphorylierung nochmals in LMP1/CD40-, LMP1/CD40//RelB- und LMP1/CD40//Nemo-defizienten B-Zellen zu vergleichen und quantitativ auszuwerten und dann zu untersuchen, über welchen Signalweg die Erk-Phosphorylierung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen aktiviert wird. Die Erk-Phosphorylierung war in den Nemo-defizienten LMP1/CD40-B-Zellen im Vergleich zu LMP1/CD40-B-Zellen signifikant erniedrigt (Abbildung 39A und B). Die Phosphorylierung

überstieg die basalen Level, die in den Kontroll-B-Zellen detektiert wurden, nicht. Hingegen war die Erk- und Jnk-Phosphorylierung in RelB-defizienten und RelB-profizienten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen vergleichbar (Abbildung 39A und B). Es sollte näher untersucht werden, über welchen Mechanismus die Nemo-vermittelte Erk-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen erfolgt.

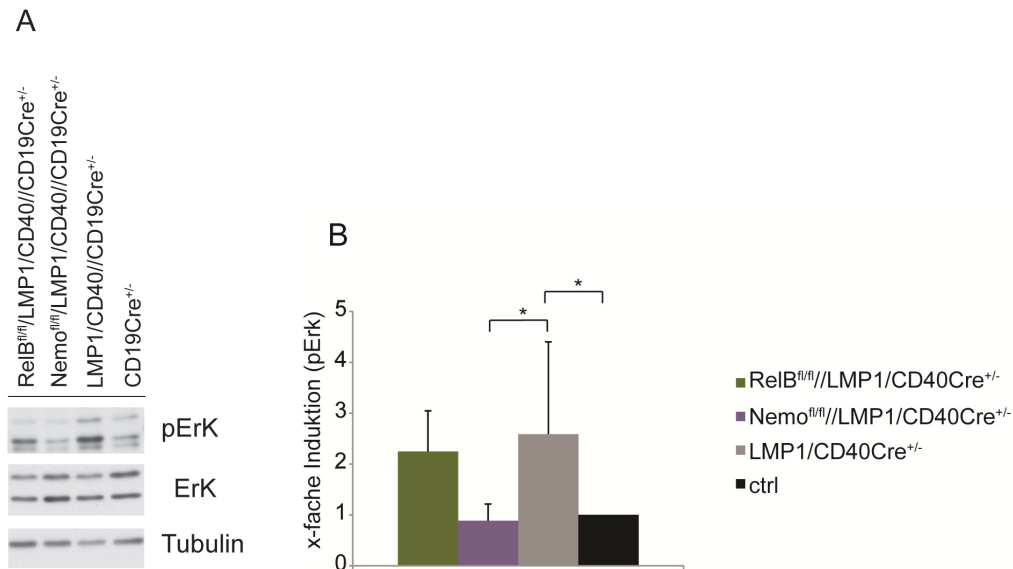


Abbildung 39 Nemo spielt eine Rolle in der LMP1/CD40-induzierten Erk-Phosphorylierung. (A) Gesamtproteine der B-Zellen von RelB^{fl/fl}/LMP1/CD40^{Cre}+/−, Nemo^{fl/fl}/LMP1/CD40^{Cre}+/−, LMP1/CD40^{Cre}+/− und Kontroll-Mäusen (ctrl) wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Erk-Phosphorylierung untersucht. Tubulin diente hier als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten. (B) Die Quantifizierung von p-Erk erfolgte mit dem ImageJ-Programm. Die Kontrolle wurden auf 1 gesetzt. * P < 0,05, berechnet mit dem zweiseitigen t-Test. n=5.

3.3.2 Die Erk-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen erfolgt möglicherweise über Akt und Tpl2

Es ist beschrieben, dass Nemo und IKK2 p105 an den Serinresten S927 und S933 phosphorylieren können, was zu dessen Degradation führt (Waterfield et al., 2004). Weiterhin ist bekannt, dass Tpl2 (Tumor progression locus 2) an p105 bindet und nach Phosphorylierung und Degradation von p105 Tpl2 freigesetzt wird. Freies und somit aktives Tpl2 führt zu einer Phosphorylierung von Erk über Mek (Eliopoulos et al., 2003). Um herauszufinden, ob Tpl2 für die Erk-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen verantwortlich ist, wurden LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen mit einem Tpl2-Inhibitor behandelt und die Erk-Phosphorylierung mittels Western-Blot untersucht (Abbildung 40). Die Ergebnisse zeigen, dass nach Behandlung mit dem Tpl2-

Inhibitor die Erk- und Jnk-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen schwächer wird. In den B-Zellen der Kontrollmäuse änderte sich nach Tpl2-Inhibitor-Behandlung weder die Erk- noch die Jnk-Phosphorylierung. Dies deutet daraufhin, dass sowohl die Jnk als auch die Erk-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen von Tpl2 abhängig ist.

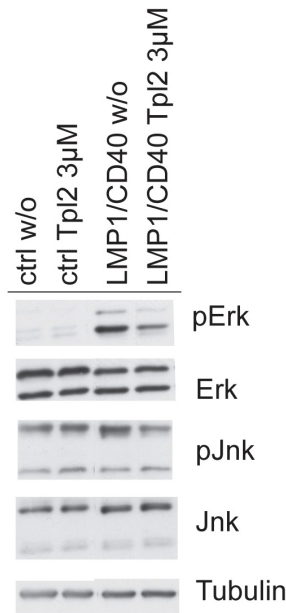


Abbildung 40 Die Aktivierung von Erk und Jnk in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen wird durch die Behandlung mit einem Tpl2-Inhibitor reduziert. Dargestellt ist ein Western-Blot mit Proteinextrakten aus unbehandelten B-Zellen von LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen oder welche die mit Tpl2-Inhibitor für eine Stunden inkubiert wurden. Es wurde die Erk- und Jnk-Phosphorylierung und die Gesamtproteine Erk und Jnk untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten.

Ein Ziel-Protein von Erk ist Msk-1 (mitogen- and stress-activated protein kinase 1), welches nach Aktivierung in den Kern wandert und p65 (RelA) am Serinrest 276 phosphoryliert. Auch in LMP1/CD40-B-Zellen war die p65-Phosphorylierung im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen erhöht (Abbildung 41). Nach Behandlung der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen mit einem MSK-1-Inhibitor (Ro-318220) konnte ein Rückgang der p65-Phosphorylierung beobachtet werden, während in der Kontrolle pp65 unbeeinflusst war.

Da gezeigt wurde, dass in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen die Erk-Phosphorylierung über PI3K vermittelt wird (Doktorarbeit C. Hojer) und Akt eines der Haupttargets von aktiver PI3K ist, sollte untersucht werden, ob Akt auch eine Rolle in der Erk-Phosphorylierung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen spielt. Hierfür wurden die B-Zellen mit einem Akt-Inhibitor (AKT8) behandelt und danach mittels Western-Blot die Erk-Phosphorylierung untersucht.

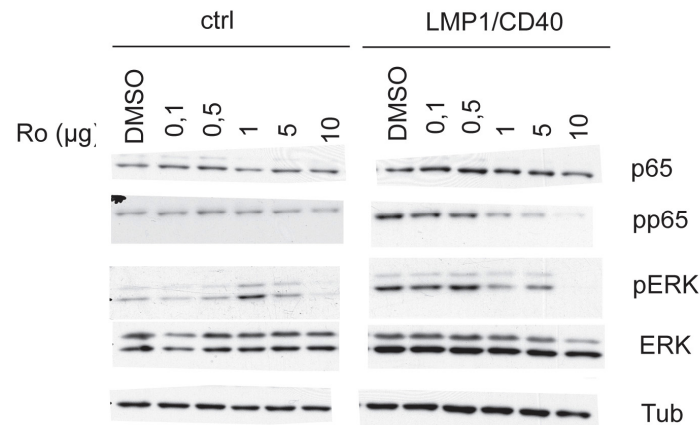


Abbildung 41 Die p65-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen ist nach Msk1-Inhibierung reduziert. Gezeigt ist ein Western-Blot mit Proteinextrakten aus unbehandelten B-Zellen von LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen oder welche, die mit Msk1-Inhibitor (Ro312228) für eine Stunden inkubiert wurden. Es wurde die Erk- und p65-Phosphorylierung und die Gesamtproteine Erk und p65 untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 42 zeigt, dass nach Akt-Inhibitor-Behandlung die Erk-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen reduziert war, wohingegen die Jnk-Phosphorylierung nicht beeinflusst war. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Akt in der Nemo-vermittelten Erk-Aktivierung involviert ist. Die Untersuchungen haben ergeben, dass Akt, Nemo und Tpl2 in der Erk-Phosphorylierung in den LMP1/CD40-B-Zellen involviert sind.

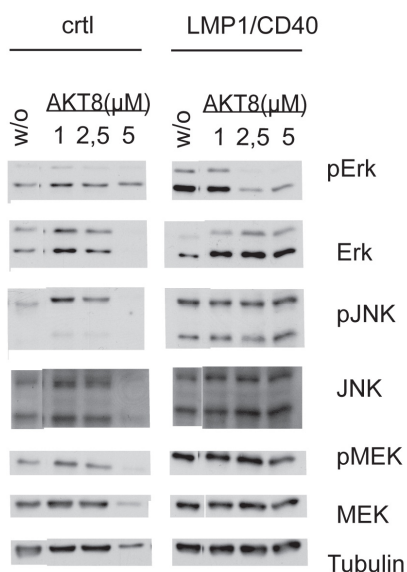


Abbildung 42 Die Akt-Phosphorylierung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen scheint eine Rolle in der Erk-Phosphorylierung zu spielen. Dargestellt ist ein Western-Blot mit Proteinextrakten aus unbehandelten (w/o) B-Zellen von LMP1/CD40- und Kontroll-Mäusen oder welche, die mit Akt-Inhibitor (AKT8) für eine Stunden inkubiert wurden. Es wurde die Erk-, Mek- und Jnk-Phosphorylierung und die Gesamtproteine Erk, Mek und Jnk untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen

Die CD40-Aktivierung in B-Zellen führt zu deren Proliferation, Überleben und Aktivierung. Wir konnten zeigen, dass die B-zellspezifische Expression eines LMP1/CD40-Fusionsproteins, das zur konstitutiven Aktivierung des CD40-Signals führt, in jungen Mäusen zu einer B-Zell-Expansion und in Mäusen die älter als ein Jahr sind, mit einer hohen Inzidenz, zur Lymphom-Entstehung führt. In LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen sind die MAPK Erk und Jnk sowie der nicht kanonische NF- κ B Signalweg verstärkt aktiv (Homig-Holzel et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle der nicht kanonische NF- κ B Signalweg bei der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Expansion spielt.

4.1.1 Veränderte Prozessierung und Lokalisation der NF- κ B Komponenten nach Inaktivierung von RelB oder IKK1 in LMP1/CD40-B-Zellen

Zuerst haben wir überprüft, welche Auswirkung die Inaktivierung von RelB und IKK1 auf die Prozessierung und Verteilung der NF- κ B -Komponenten im Zytoplasma und Kern der LMP1/CD40-B-Zellen hat. Nach RelB-Deletion in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen konnte kein RelB-Protein weder im Kern noch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die loxP-vermittelte Deletion des *RelB*-Gens in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen sehr effizient ist. Die Inaktivierung von RelB führte außerdem zu deutlich niedrigeren p52-Level. Ein Grund für die geringe Prozessierung von p100 zu p52 könnte sein, dass RelB für die p100-Stabilisierung benötigt wird (Maier et al., 2003). Bei Abwesenheit von RelB wird p100 verstärkt degradiert und nur noch zu einem geringen Anteil zu p52 prozessiert. Jedoch war p52 immer noch im Kern detektierbar. Da RelB nicht mehr vorhanden ist, muss man voraussetzen, dass p52 mit sich selbst Homodimere oder mit anderen NF- κ B-Komponenten Heterodimere bildet. Denkbar wäre eine Dimer-Bildung mit p50, c-Rel oder p65 (Grumont and Gerondakis, 1994; Hayden and Ghosh, 2004; Liou et al., 1994). Die Inaktivierung von IKK1 in LMP1/CD40-B-Zellen führte zur Akkumulation der p100-Proteine im Zytoplasma. Dies deutet auf eine verringerte Prozessierung von p100 zu

p52, nach IKK1-Deletion hin. Jedoch war die Hemmung der p100-Prozessierung nicht vollständig, da im Kern der IKK1//LMP1/CD40-B-Zellen immer noch p52-Proteine vorhanden waren. Die residualen Mengen von p52, die noch im Kern detektiert wurden, sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass NIK (NF- κ B-Induced-Kinase) zu einem gewissen Grad direkt auf p100 wirken kann und somit die Prozessierung auch in Abwesenheit von IKK1 einleiten kann (Xiao et al., 2001). Kürzlich wurde publiziert, dass in Mäusen, die ein nicht funktionelles IKK1-Protein exprimieren und somit p100 nicht phosphorylieren können, die Prozessierung von p100 zu p52 ebenfalls stark reduziert aber nicht vollkommen gehemmt war (Balkhi et al., 2012).

Die RelB-Level im Kern von IKK1//LMP1/CD40-B-Zellen waren trotz der erniedrigten p52 Level im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen immer noch deutlich erhöht. Da die erhöhten p50-Level im Kern der LMP1/CD40-B-Zellen, nach Deletion von IKK1, unverändert waren, ist denkbar, dass RelB sowohl mit p50 als auch mit p52 Dimere bilden kann. Weitere Experimente werden Aufschlüsse darüber geben, welche Dimere in den IKK1//LMP1/CD40- und RelB//LMP1/CD40-B-Zellen im Vergleich zu LMP1/CD40-B-Zellen gebildet werden.

4.1.2 Die konstitutive Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs beeinflusst die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark

Um herauszufinden, ob die Deletion von RelB oder IKK1 die frühe B-Zell-Entwicklung der transgenen LMP1/CD40-Mäuse beeinflusst, wurden die verschiedenen B-Zell-Stadien im Knochenmark untersucht. Die LMP1/CD40-Mäuse wiesen einen leichten Block in der B-Zell-Entwicklung am Übergang vom Pro- zum Prä-B-Zellstadium auf. Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen konnte diesen Phänotyp revidieren. Dies weist darauf hin, dass die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen für den partiellen Block in der B-Zell-Entwicklung verantwortlich ist. Diese Annahme wird von publizierten Daten unterstützt: P100-defiziente Mäuse weisen ebenfalls einen Block in der B-Zell-Entwicklung auf. Diese Mäuse exprimieren nur p52 und nicht p100 und imitieren somit einen konstitutiv aktiven nicht kanonischen NF- κ B Signalweg. Die Deletion eines RelB-Allels reichte aus, um den Block in der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark aufzuheben (Guo et al., 2008). Der Block im Pro-Prä-B-Zellstadium in den LMP1/CD40-Mäusen war nicht so ausgeprägt wie es in dieser Publikation beschrieben wurde. Dies könnte damit zusammenhängen, dass es sich bei den p100-defizienten

Mäusen um einen Komplet-Knockout handelt und bei den LMP1/CD40-Mäusen um einen konditionalen Knockout. Da CD19-cre in nur ca. 20% der Pro-B-Zellen zur Deletion führt, ist zu erwarten, dass in LMP1/CD40//CD19-cre Mäuse in den meisten Pro-B-Zellen die Stopp-Kassette noch nicht deletiert ist. Alle undeletierten B-Zellen können sich somit normal entwickeln.

Als Kontrollen wurden Mäuse mit RelB- oder IKK1-defizienten B-Zellen, in Abwesenheit von LMP1/CD40, untersucht. Meine Daten zeigen, dass diese Mäuse eine normale B-Zell-Entwicklung haben und deuten somit darauf hin, dass RelB oder IKK1 für die normale B-Zell-Entwicklung nicht benötigt werden. Diese Ergebnisse unterstützen bereits publizierte Daten, die ebenfalls darauf hinweisen, dass die Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs für die B-Zell-Entwicklung nicht benötigt wird: (I) Bestrahlte Wildtyp-Mäuse, denen IKK1-defiziente Knochenmarks-Zellen transplantiert wurden (=Knochenmarks-Chimäre), wiesen eine normale B-Zell-Entwicklung auf (Kaisho et al., 2001). (II) Ebenso war die B-Zell-Entwicklung in Nfkb2^{-/-}(p100)-Mäusen normal (Caamano et al., 1998).

Die verminderten B-Zellzahlen im Knochenmark von LMP1/CD40-Mäusen waren nicht nur auf den Block in der B-Zell-Entwicklung, sondern auch auf eine verminderte Anzahl an rezirkulierenden B-Zellen zurückzuführen. Die Inaktivierung von RelB oder IKK1 konnte den Anteil rezirkulierender B-Zellen im Knochenmark wieder auf Kontrollniveau anheben. Dies deutet darauf hin, dass der hyperaktive nicht kanonische NF- κ B Signalweg der Grund für die verminderten rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark der LMP1/CD40-Mäuse ist.

4.1.3 Der Einfluss des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs in der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Expansion

Da der nicht kanonische NF- κ B Signalweg in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen verstärkt aktiv ist, kam die Frage auf, ob dieser auch für die B-Zell-Expansion und Lymphom-Entstehung in diesen Mäusen verantwortlich ist (Homig-Holzel et al., 2008). Es gibt einige Hinweise, dass eine konstitutive Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs zur B-Zell-Expansion und in einigen Fällen zur Lymphom-Entstehung führt: (I) Transgene Mäuse, die eine mutierte Form vom p52-Protein, welches keine transkriptionelle Repressor-Funktion mehr besitzt, exprimieren, entwickeln B-Zell-Lymphome (Zhang et al., 1994; Zhang et al., 2007). (II)+(III) Die Inaktivierung von TRAF2 oder TRAF3 führt zu einer Hyperaktivierung des nicht kanonischen NF- κ B

Signalwegs, da NIK nicht mehr von TRAF2 und TRAF3 gebunden werden kann und somit der proteasomalen Degradation entgeht. Mäuse mit TRAF2-defizienten oder TRAF3-defizienten B-Zellen weisen somit B-zellspezifisch einen konstitutiv aktiven nicht kanonischen NF- κ B Signalweg auf. Mäuse mit TRAF2-defizienten B-Zellen haben zwar eine B-Zell-Expansion, entwickeln aber keine Lymphome (Grech et al., 2004). Mäuse mit TRAF3-defizienten B-Zellen weisen eine B-Zell-Expansion auf (Xie et al., 2007) und entwickeln B-Zell-Lymphome in der Milz (Moore et al., 2012). TRAF3-Mutationen wurden außerdem in Hodgkin Lymphomen, splenischen Marginalzonen-Lymphomen (MZL) (Rossi et al., 2012), B-Zell-chronischer lymphatischer Leukämie, Mantelzell-Lymphomen und auch in multiplen Myeloma nachgewiesen (Annunziata et al., 2007; Keats et al., 2007).

Die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40-B-Zellen hatte keinen Einfluss auf die B-Zell-Expansion, wohingegen die IKK1-Deletion in LMP1/CD40-B-Zellen zu einer Reduktion der B-Zellzahlen und des Milzgewichtes führte. Die Ergebnisse zeigen, dass die verstärkte Translokation von RelB in den Kern nicht für die B-Zell-Expansion in den LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich ist. Der Rückgang der B-Zellzahlen nach Inaktivierung von IKK1, könnte dadurch verursacht werden, dass IKK1 nicht nur die Aktivität des nicht kanonischen Signalwegs steuert, sondern auch Bestandteil des IKK-Komplexes ist. Der IKK-Komplex ist ein trimärer Komplex, der aus IKK1, IKK2 und Nemo besteht und den kanonischen NF- κ B Signalweg aktiviert, indem es I κ B α phosphoryliert. Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass durch die Inaktivierung von Nemo in den LMP1/CD40-B-Zellen die B-Zell-Expansion stark beeinträchtigt war und die B-Zellzahlen sogar auf Kontrollniveau reduziert waren. Nach IKK2-Deletion in LMP1/CD40-B-Zellen kam es, wie in IKK1//LMP1/CD40-Mäusen, zu einem intermediären Phänotyp. Wir vermuten, dass nach Inaktivierung von IKK1 in den LMP1/CD40-B-Zellen, der IKK-Komplex weniger stabil ist und somit die Signale, die über den IKK-Komplex weitergeleitet werden, abgeschwächt sind.

In LMP1/CD40-Mäusen sind vor allem die MZ-B-Zellen (CD21^{hoch}CD23⁺) stark expandiert (Homig-Holzel et al., 2008). Für diesen Phänotyp könnte die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs verantwortlich sein. (I) Mäuse mit TRAF2- oder TRAF3-defizienten B-Zellen, in denen der nicht kanonische NF- κ B Signalweg verstärkt aktiv ist, haben eine erhöhte Anzahl an MZ-B-Zellen und damit einhergehend eine vergrößerte Marginalzone (Grech et al., 2004; Xie et al., 2007). (II) Weiterhin ist bekannt, dass Mäuse, die nur das p52-Protein exprimieren und somit

ubiquitär einen konstitutiv aktiven nicht kanonischen NF- κ B Signalweg haben, ebenfalls vermehrt MZ-B-Zellen in der Marginalzone aufweisen. Nach Deletion eines RelB-Allels gehen die MZ-B-Zellen auf Kontrollniveau zurück. Jedoch ist nicht klar, ob es sich hierbei tatsächlich um einen B-Zell-intrinsischen Effekt handelt (Guo et al., 2007).

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die verstärkte Translokation des Heterodimers p52/RelB in den Kern der LMP1/CD40-B-Zellen ausschlaggebend für die MZ-B-Zell-Expansion ist. Die RelB-Deletion in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führte nur zu einem leichten tendenziellen Rückgang der MZ-B-Zellen. Dies deutet daraufhin, dass die Translokation von RelB in den Kern für die Bildung von MZ-B-Zellen nahezu keine Rolle spielt. Die Deletion von IKK1 hingegen führte zur Reduktion der MZ-B-Zellzahlen auf Kontrollniveau. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass IKK1 zur MZ-B-Zell-Expansion beiträgt. Da die Inaktivierung von RelB nur einen geringen Einfluss auf die Anzahl von MZ-B-Zellen hat, vermuten wir, dass IKK1 hauptsächlich über seine Funktion im IKK/Nemo-Komplex zur Expansion von MZ-B-Zellen beiträgt. Es gibt Hinweise, dass der kanonische NF- κ B Signalweg, der über den IKK/Nemo-Komplex reguliert wird, bei der Bildung von MZ-B-Zellen eine wichtigere Rolle spielt: (I) P50-, p65- und c-Rel-defiziente Mäuse weisen eine defekte MZ-B-Zell-Entwicklung auf (Cariappa et al., 2000). (II) Mäuse mit Nemo- oder IKK2-defizienten B-Zellen entwickeln keine MZ-B-Zellen (Pasparakis et al., 2002). (III) Mäuse, die B-zell-spezifisch eine konstitutiv aktive IKK2-Kinase exprimieren, haben eine Expansion von MZ-B-Zellen (Sasaki et al., 2006). Auch in LMP1/CD40-B-Zellen haben wir Hinweise, dass zumindest der IKK-Komplex in die Bildung bzw. Expansion von MZ-B-Zellen involviert ist. So führte die Inaktivierung von IKK2 oder Nemo in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen zu einer Reduktion des prozentualen Anteils der MZ-B-Zellen auf Kontrollniveau (Schmidl, 2010). Dies könnte darauf hindeuten, dass nach IKK1-Deletion in LMP1/CD40-B-Zellen die MZ-B-Zell-Bildung vermindert ist, weil IKK1 im IKK-Komplex fehlt und dieser deshalb nicht mehr voll funktionsfähig ist.

Über welchen Mechanismus NF- κ B zur MZ-B-Zell-Bildung oder -Expansion führt ist noch unbekannt. In LMP1/CD40-Mäusen fiel auf, dass sowohl in Fo-B- als auch in MZ-B-Zellen die CD21-Expression sehr hoch ist. CD21 ist ein typisches Notch2-Zielgen und es ist deshalb möglich, dass in LMP1/CD40-B-Zellen der Notch2-Signalweg verstärkt ist. Unsere und andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Notch2 für die MZ-B-Zell-Entwicklung essentiell ist (Hampel et al., 2011). Es ist möglich, dass in LMP1/CD40-B-Zellen der Notch2-Rezeptor verstärkt exprimiert wird und dass nach Inaktivierung von

IKK1, IKK2 oder Nemo die Expression wieder auf Kontrollniveau reduziert ist (NF- κ B-Bindestelle in der Promoterregion des *Notch2*-Gens; L.J. Strobl, persönliche Kommunikation). Um diese Hypothese zu überprüfen, werden wir die Expression von Notch2 und Notch2-Zielgenen (*Hes* und *Deltex*) untersuchen.

Die Analyse der Einzel-Knockout-Mäuse ergab, dass in Mäusen, die RelB- oder IKK1-defiziente B-Zellen haben, noch MZ-B-Zellen gebildet werden. Diese Ergebnisse waren etwas überraschend, da von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, dass nach Transplantation von RelB-defizienten Knochenmarks-Zellen in bestrahlte Wildtyp-Mäuse keine MZ-B-Zellen entstehen (Weih et al., 2001). Weiterhin wurde publiziert, dass NF- κ B2-defiziente Mäuse, denen sowohl p100 als auch p52 fehlt, weniger MZ-B-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen entwickeln (Franzoso et al., 1998). Diese Daten deuten gemeinsam mit unseren Daten darauf hin, dass RelB und IKK1 nicht in den B-Zellen sondern in anderen hämatopoetischen Zellen benötigt wird, um die Entstehung von MZ-B-Zellen zu erlauben.

4.1.4 Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs hält die MZ-B-Zellen im Follikel zurück

Wir konnten mittels histologischer Schnitte zeigen, dass die vermehrten MZ-B-Zellen der LMP1/CD40-Mäuse nicht alle in der Marginalzone sitzen. Nach Inaktivierung von RelB oder IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen waren die MZ-B-Zellen wieder verstärkt in der Marginalzone zu finden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in LMP1/CD40-Mäusen die MZ-B-Zellen durch die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs im Follikel zurückgehalten werden. Da bekannt ist, dass Mäuse mit CXCR4-defizienten B-Zellen keine MZ-B-Zellen in der Marginalzone aufweisen (Nie et al., 2004), haben wir die CXCR4-Expressionslevel der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen untersucht. LMP1/CD40-B-Zellen hatten im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen eine verminderte CXCR4-Expression. Nach RelB- oder IKK1-Deletion in LMP1/CD40-B-Zellen war die CXCR4-Expression auf den B-Zellen wieder auf Kontrollniveau erhöht. Weitere Oberflächenmarker, die bei der Wanderung oder Retention der MZ-B-Zellen wichtig sind, wie S1PR-1 und CXCR5, waren unverändert. Dies deutet darauf hin, dass der konstitutiv aktive nicht kanonische NF- κ B Signalweg die CXCR4-Expression negativ beeinflusst. Die niedere CXCR4-Expression in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen ist eventuell für die Retention der MZ-B-Zellen im Follikel verantwortlich. Allerdings muss noch durch weitere FACS-Färbungen (z.B. CD9 oder

CD1d) gezeigt werden, ob die MZ-B-Zellen in den LMP1/CD40-Mäusen tatsächlich vermehrt sind und ob sich diese Zellen im Follikel befinden. Eine weitere Möglichkeit, warum sich die MZ-B-Zellen der LMP1/CD40-Mäuse im Follikel befinden, könnte sein, dass die verstärkte RelB-Expression dazu führt, dass CD23 auf den MZ-B-Zell-Vorläufern nicht mehr runterreguliert werden kann und deshalb die Vorläufer-Zellen nicht zu MZ-B-Zellen fertig differenzieren können.

In den transgenen LMP1/CD40-Mäusen wurden weniger reife B-Zellen im Knochenmark und weniger B1-Zellen im Peritoneum detektiert. Dagegen wurde eine Akkumulation der B-Zellen in den Follikeln der Milz und Lymphknoten nachgewiesen. Nach Deletion von RelB oder IKK1 in LMP1/CD40-B-Zellen waren weniger B-Zellen in den Lymphknoten zu detektieren und dafür mehr im Knochenmark und Peritoneum. Diese Daten deuten darauf hin, dass der nicht kanonische NF- κ B Signalweg an der Retention der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in der weißen Pulpa der Milz und im Lymphknoten beteiligt sein könnte.

4.1.5 Der Einfluss von RelB und IKK1 auf das Überleben und die Proliferation LMP1/CD40-exprimierender B-Zellen in vitro

LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen haben ein verlängertes Überleben und eine verstärkte Proliferation nach ex-vivo Isolation im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen (Homig-Holzel et al., 2008). Die Deletion von RelB hat keinen Einfluss auf das Überleben und die Proliferation LMP1/CD40-exprimierender B-Zellen. Nach Inaktivierung von IKK1 zeigt sich eine leichte Reduktion der überlebenden LMP1/CD40-B-Zellen. RelB- oder IKK1-defiziente B-Zellen proliferierten nach CD40-Stimulation vergleichbar wie anti-CD40-stimulierte Kontroll-B-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs für das Überleben und die Proliferation CD40-stimulierter B-Zellen nicht notwendig ist. Unsere und von anderen Gruppen publizierte Daten deuten darauf hin, dass der kanonischen NF- κ B Signalweg wichtiger für das Überleben und die Proliferation von CD40-stimulierten B-Zellen ist, als der nicht kanonische NF- κ B Signalweg. CD40-stimulierte p52^{-/-}-B-Zellen konnten im Gegensatz zu p50^{-/-} oder c-Rel^{-/-}-B-Zellen noch proliferieren (Zarnegar et al., 2004). Li und seine Kollegen haben gezeigt, dass IKK2-defiziente B-Zellen mit und ohne Stimulus im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen schlechter überleben (Li et al., 2003). Unstimulierte Nemo-defiziente LMP1/CD40-B-Zellen überlebten in Kultur deutlich schlechter als RelB-defiziente LMP1/CD40-B-Zellen (Schmidl, 2010). Die Ergebnisse zeigen, dass der

kanonische NF- κ B Signalweg, aber nicht der nicht kanonische, für das Überleben der LMP1/CD40-B-Zellen essentiell ist. Die IKK1-Inaktivierung führt wahrscheinlich zur Destabilisierung des IKK-Komplexes und hat dadurch einen negativen Einfluss auf das Überleben LMP1/CD40-exprimierender B-Zellen.

4.1.6 In Abwesenheit von RelB führen LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen zur Bildung von T_{fh}-Zellen

Hu und seine Kollegen konnten zeigen, dass der nicht kanonische NF- κ B Signalweg die Liganden-Expression des „inducible costimulator ligand“ (ICOS-L) auf B-Zellen reguliert. In NIK-defizienten Mäusen wurde im Vergleich zu Wildtypmäusen weniger ICOS-L auf der Oberfläche der B-Zellen exprimiert. Weiterhin bildeten sich, nach TD-Immunisierung, weniger T-follikuläre Helferzellen (T_{fh}-Zellen) und weniger Keimzentren. Nach Injektion vom rekombinanten ICOS-L konnten wieder T_{fh}-Zellen gebildet werden. Die Daten zeigen, dass ICOS-L für die T_{fh}-Zell-Bildung verantwortlich ist (Hu et al., 2011). Um herauszufinden, ob ICOS-L in den LMP1/CD40-B-Zellen durch die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs vermehrt exprimiert wird, wurde die ICOS-L-Expression in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in An- und Abwesenheit von RelB und IKK1 untersucht. Auf LMP1/CD40-B-Zellen war ICOS-L im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen stärker exprimiert. Hingegen war in RelB//LMP1/CD40- und IKK1//LMP1/CD40-B-Zellen die ICOS-L-Expression im Vergleich zu LMP1/CD40-B-Zellen erniedrigt. Dies bestätigt, dass ICOS-L in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen durch die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs hochreguliert wird. Nach den Daten von Hu und seinen Kollegen könnte dies zur verstärkten Bildung von T_{fh}-Zellen führen. Deshalb wurde der Anteil von T_{fh}-Zellen in LMP1/CD40-Mäusen in An- und Abwesenheit von RelB und IKK1 untersucht. Die erhöhte ICOS-L Expression in LMP1/CD40-B-Zellen führte zu keiner spontanen Bildung von T_{fh}-Zellen.

Dies passt zu den Daten, dass in LMP1/CD40-Mäusen nie eine spontane Keimzentrumsreaktion beobachtet wurde und auch nach TD-Immunisierung keine Keimzentren nachweisbar waren. Dies deutet darauf hin, dass das LMP1/CD40-Signal die Keimzentrumsreaktion eher hemmt als positiv begünstigt.

Erstaunlicherweise konnte aber nach Deletion von RelB in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen die spontane Bildung von T_{fh}-Zellen nachgewiesen werden. Die T_{fh}-Zellen in den RelB//LMP1/CD40-Mäusen wurden durch die Marker CD4, CXCR5, PD-1 und den Transkriptionsfaktor Bcl-6 charakterisiert. Ein weiteres Charakteristikum von T_{fh}-Zellen

ist, dass sie IL-21 und IL-4 ausschütten. Ob die T_{fh}-Zellen in den RelB//LMP1/CD40-Mäusen auch IL-21 und IL-4 ausschütten muss noch untersucht werden.

Diese Daten deuten darauf hin, dass CD40-stimulierte B-Zellen bei der Bildung von T_{fh}-Zellen eine Rolle spielen könnte. Diese Fähigkeit geht jedoch verloren, sobald die CD40-Stimulation zur Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs führt und vermehrt RelB in den Kern transloziert wird. Es ist bekannt, dass bei CD40-Stimulation zuerst der kanonische und dann verzögert der nicht kanonische Signalweg aktiviert wird. Es wäre möglich, dass wenn B-Zellen sehr lange über einen CD40-Liganden stimuliert werden, sie die Eigenschaft verlieren einen Beitrag zur Bildung von T_{fh}-Zellen zu leisten. Über welchen Mechanismus die CD40-stimulierten B-Zellen zur Bildung von T_{fh}-Zellen führen und warum diese nach Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs diese Fähigkeit verlieren, ist noch unklar.

Eine verstärkte T_{fh}-Zell-Bildung wurde unter anderem auch in PD-L1-defizienten Mäusen nachgewiesen (Hams et al., 2011). Good-Jacobson und seine Kollegen haben gezeigt, dass PD-L1/PD-L2-defiziente-Mäuse mehr T_{fh}-Zellen entwickelten. Diese waren jedoch funktionell beeinträchtigt, da sie weniger IL-4- und IL-21-mRNA produziert haben (Good-Jacobson et al., 2010). PD-L1 wurde in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen höher als in Kontroll-B-Zellen exprimiert. Sowohl die Inaktivierung von RelB als auch IKK1 führte zu einer Reduktion der PD-L1-Expression in LMP1/CD40-B-Zellen, jedoch war diese im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen immer noch höher. Diese Daten sprechen dafür, dass die Expressionsstärke von PD-L1-nicht alleinig für die spontane Bildung von T_{fh}-Zellen in RelB-defizienten LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich sein kann.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine aktivierte B-Zelle, wie in den LMP1/CD40-Mäusen, die Bildung der T_{fh}-Zellen fördert und dass aber eine hohe RelB-Konzentration im Kern dies in irgendeiner Weise unterdrückt. In IKK1//LMP1/CD40-Mäusen kam es zu keiner spontanen Bildung der T_{fh}-Zellen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass das noch im Kern vermehrt vorhandene RelB die Bildung von T_{fh}-Zellen verhindert.

4.2 Der nicht kanonische NF- κ B Signalweg ist nicht für die Abwesenheit der Keimzentren in LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich

LMP1/CD40-Mäuse, die mit einem T-Zell-abhängigen Antigen immunisiert wurden, konnten keine Keimzentren ausbilden (Homig-Holzel et al., 2008). Einer der Gründe könnte sein, dass in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen der nicht kanonische NF- κ B

Signalweg verstärkt aktiv ist. Um dies herauszufinden, wurden die RelB//LMP1/CD40- und IKK1//LMP1/CD40-Mäuse TD immunisiert und untersucht. Weder die Deletion von RelB noch von IKK1 konnten den Phänotyp der LMP1/CD40-Mäuse revidieren.

Die NP-spezifischen IgM- und IgG1-Antikörpertiter der LMP1/CD40-Mäuse waren im Vergleich zu denen von immunisierten Kontrollmäusen stark erniedrigt und im Vergleich zu unimmunisierten Mäusen nur leicht erhöht. In den RelB//LMP1/CD40-Mäusen wurden mehr NP-spezifische IgM- und IgG1-sezernierende Plasmazellen und höhere NP-spezifische IgM- und IgG1-Antikörpertiter im Vergleich zu LMP1/CD40-Mäusen detektiert. Die Titer der IgM-Antikörper waren sogar vergleichbar mit denen von Kontrollmäusen. Da die hochspezifischen NP-spezifischen Antikörpertiter auch in RelB//LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen immer noch, ähnlich wie in LMP1/CD40-Mäusen, erniedrigt waren und keine Keimzentren nachgewiesen werden konnten, gehen wir davon aus, dass die Antigen-spezifischen IgM- und IgG1-Antikörper hauptsächlich während der extrafollikulären Plasmazell-Differenzierung gebildet wurden. In IKK1//LMP1/CD40-Mäusen waren sowohl die Titer als auch die Plasmazellen vergleichbar zu denen von LMP1/CD40-Mäusen. Hierfür könnte wieder die verstärkte RelB-Translokation in den Kern der IKK1/LMP1/CD40-B-Zellen verantwortlich sein.

Eine Erklärung für eine verstärkte extrafollikuläre Immunantwort von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in Abwesenheit von RelB könnten die spontan gebildeten T_{fh} Zellen sein. Generell werden für die Aktivierung von B-Zellen, nach Antigenkontakt, T_{fh}-Zellen an der B-T-Zellzone benötigt (Kerfoot et al., 2011; Kitano et al., 2011; Lee et al., 2011). Außerdem befinden sich T_{fh}-Zellen im Keimzentrum und liefern dort den B-Zellen Überlebenssignale (Choi et al., 2011; Yusuf et al., 2010).

Lee und seine Kollegen konnten zeigen, dass Mäuse mit Bcl-6-defizienten T-Zellen, die keine T_{fh}-Zellen bilden können, nach TD-Immunisierung weniger extrafollikuläre Plasmablasten und IgG1-Antikörper haben. Dies weist auf eine Beteiligung der Bcl-6⁺-T_{fh}-Zellen bei der extrafollikulären Immunantwort hin. Die Autoren gehen davon aus, dass es zwei unterschiedliche T_{fh}-Zell-Populationen gibt: Die Bcl-6⁺PD-1^{niedrig}CD3⁺-T-Zellen befinden sich an der B-T-Zellzone und sind für die Produktion der IgG1-Antikörper-sezernierenden Plasmazellen essentiell (Lee et al., 2011). Diese Population spielt wahrscheinlich bei der extrafollikulären Immunantwort eine Rolle. Im Gegensatz dazu befinden sich Bcl-6⁺PD-1^{hoch}CD3⁺-T-Zellen im Keimzentrum und liefern dort den Keimzentrums-B-Zellen Überlebenssignale. Daher kann es sein, dass die in

RelB//LMP1/CD40-Mäusen vorhandenen Bcl-6⁺CD4⁺CXCR5⁺PD-1^{niedrig}-T_{fh}-Zell-Population, die ebenfalls vermehrt vorkommt, für die verstärkte extrafollikuläre Immunantwort verantwortlich ist. Die Bcl-6⁺CD4⁺CXCR5⁺PD-1^{hoch}-T_{fh}-Zell-Population, ist eventuell dafür da, um eine Keimzentrumsreaktion einzuleiten, diese wird jedoch durch das konstitutiv aktive CD40-Signal verhindert.

Einige Daten deuteten darauf hin, dass die Aktivierung des nicht kanonischen NF-κB Signalwegs eine Voraussetzung für eine effiziente TD- und TI-Immunantworten ist. (I) Weih und seine Kollegen haben gezeigt, dass RelB sowohl für die TD- als auch TI-Immunantwort wichtig ist. In RelB^{-/-}-Mäusen war nach TD-Immunisierung die IgG1- und nach TI-Immunisierung die IgG1- und IgG3-Antikörperkonzentration im Vergleich zu Kontrollmäusen stark vermindert (Weih et al., 1997). (II) P52^{-/-}-Mäuse können keine Keimzentren ausbilden und haben nach TD- und TI-Immunisierung eine verschlechterte Immunantwort (Franzoso et al., 1998; Caamano et al., 1998). (III) Nach Transplantation von IKK1-defizienten Knochenmarks-Zellen oder IKK1-defizienten fötalen Leberzellen ist die T-Zell-abhängige Immunantwort gestört (Senftleben et al., 2001; Kaisho et al., 2001).

Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass sowohl RelB-defiziente als auch IKK1-defiziente B-Zellen Keimzentren ausbilden können und die IgM- sowie IgG1-Antikörpertiter im Serum vergleichbar mit denen von Kontrollmäusen sind. Somit spielen RelB und IKK1 in den B-Zellen keine wichtige Rolle während der T-Zell-abhängigen Immunreaktion.

4.3 Nemo ist für die Erk-Phosphorylierung und B-Zell-Expansion in den LMP1/CD40-Mäusen verantwortlich

Die Behandlung ex vivo isolierter LMP1/CD40-exprimierender B-Zellen mit dem Mek-Inhibitor (U0126) zeigte, dass die Erk-Phosphorylierung für das verbesserte Überleben der LMP1/CD40-B-Zellen wichtig ist (Homig-Holzel et al., 2008). In Nemo-defizienten LMP1/CD40-B-Zellen ist die Erk-Phosphorylierung im Vergleich zu LMP1/CD40-B-Zellen stark erniedrigt und die Zellen überleben und proliferieren schlechter (Schmidl, 2010). Da der kanonische NF-κB Signalweg in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen nicht hyperaktiviert ist, kam die Frage auf, ob in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen Erk über Nemo phosphoryliert wird, und Nemo dadurch zum besseren Überleben von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen beiträgt. Meine Aufgabe war es deshalb, eine

mögliche Verbindung zwischen Nemo und der verstärkten Erk-Phosphorylierung in LMP1/CD40-B-Zellen zu finden.

Es gibt in der Literatur mehrere Hinweise, dass eine Verbindung zwischen dem IKK-Komplex und der Erk-Phosphorylierung besteht: (I) In HEK293-Zellen phosphoryliert der IKK-Komplex p105 an bestimmten Serinstellen (S927 und S932) (Heissmeyer et al., 2001). (II) Das Tpl2-Protein (tumor progression locus 2), das zur Proteinfamilie der MAP3-Kinasen gehört, ist in ruhenden Zellen, dadurch, dass es an p105 gebunden ist, inaktiv. Eine p105-Phosphorylierung und Degradation führt zur Freisetzung und dadurch zur Aktivierung von Tpl2 (Beinke et al., 2003; Beinke et al., 2004; Belich et al., 1999; Waterfield et al., 2003). (III) In Makrophagen agiert Tpl2 als Mek-Kinase, die zur Erk-Phosphorylierung führt (Gantke et al., 2012; Waterfield et al., 2004). (IV) In B-Zellen von Tpl2-Knockout-Mäusen kann Erk nach CD40-Stimulation nicht mehr aktiviert werden (Eliopoulos et al., 2003). In Makrophagen von NF- κ B1SSAA knock-in Mäusen, die eine mutierte Form von p105SSAA (S930A- und S935A-Mutationen) exprimieren, die durch den IKK-Komplex nicht mehr phosphoryliert werden kann, kann Erk nach LPS- oder TNF-Stimulation nicht mehr phosphoryliert werden (Yang et al., 2012).

Diese publizierten Daten führten zu der Hypothese, dass in den LMP1/CD40-B-Zellen die Erk-Phosphorylierung über den IKK/p105/Tpl2-Signalweg vermittelt wird. Um diese Hypothese zu bestätigen, haben wir LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen mit einem Tpl2-Inhibitor behandelt und konnten zeigen, dass diese Behandlung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen zu einer Abschwächung der Erk-Phosphorylierung führt. Es ist bekannt, dass in MEF-Zellen p65 über Tpl2 \rightarrow Mek \rightarrow Erk \rightarrow von Msk1 phosphoryliert wird (Das et al., 2005). Die p65-Phosphorylierung war in den LMP1/CD40-B-Zellen im Vergleich zu den Nemo//LMP1/CD40-B-Zellen verstärkt und die verstärkte p65-Phosphorylierung konnte durch eine Msk1-Inhibitor-Behandlung rückgängig gemacht werden. Dies spricht dafür, dass dieser Signalweg auch in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen aktiv ist.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Erk-Phosphorylierung nach Akt-Inhibitor-Behandlung in den LMP1/CD40-B-Zellen auf Kontrollniveau gesunken ist, was für eine Beteiligung von Akt bei der Erk-Phosphorylierung spricht. Ob Akt oberhalb oder unterhalb des NF- κ B Signalwegs in die Aktivierung von Erk eingreift, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Frühere Arbeiten aus unserem Labor, die zeigen, dass die Erk-Phosphorylierung nach Deletion von CD19 und nach PI3K-Inhibitor-Behandlung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen auf Kontrollniveau zurück geht,

sprechen dafür, dass in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen Akt CD19-abhängig über PI3K aktiviert wird und somit oberhalb von NF- κ B wirkt. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass Akt über den IKK-Komplex aktiviert wird. Meng und seine Kollegen haben gezeigt, dass die Akt-Phosphorylierung erst nach der Aktivierung des kanonischen NF- κ B Signalwegs erfolgt und dass nach NF- κ B-Inhibitor-Behandlung die Akt-Phosphorylierung erniedrigt war (Meng et al., 2002).

Abbildung 43 zeigt ein Signalwegs-Modell, welches die Abhängigkeit der LMP1/CD40-induzierten Erk-Phosphorylierung von Nemo und Akt erklären könnte. Nemo und IKK2 sind für die Phosphorylierung von p105 zuständig, was zu dessen proteasomaler Degradation führt. Das vorher an p105 gebundene Tpl2 wird frei und kann über Mek Erk phosphorylieren. Zeitgleich führt die konstitutive CD40-Aktivität auch zur CD19-Aktivierung, phosphoryliert Erk über PI3K und Akt. Höchstwahrscheinlich ist sowohl die konstitutive Erk-Phosphorylierung als auch die Akt-Phosphorylierung für das verbesserte Überleben notwendig. Hier ist es wichtig zu untersuchen, wie diese beiden Signalwege interagieren und welche Rolle Tpl2 bei der Erk-Phosphorylierung spielt. Vor allem sollte die Frage beantwortet werden, ob Akt über Nemo im Signalweg steht oder ob Akt durch den Nemo/IKK-Komplex aktiviert wird.

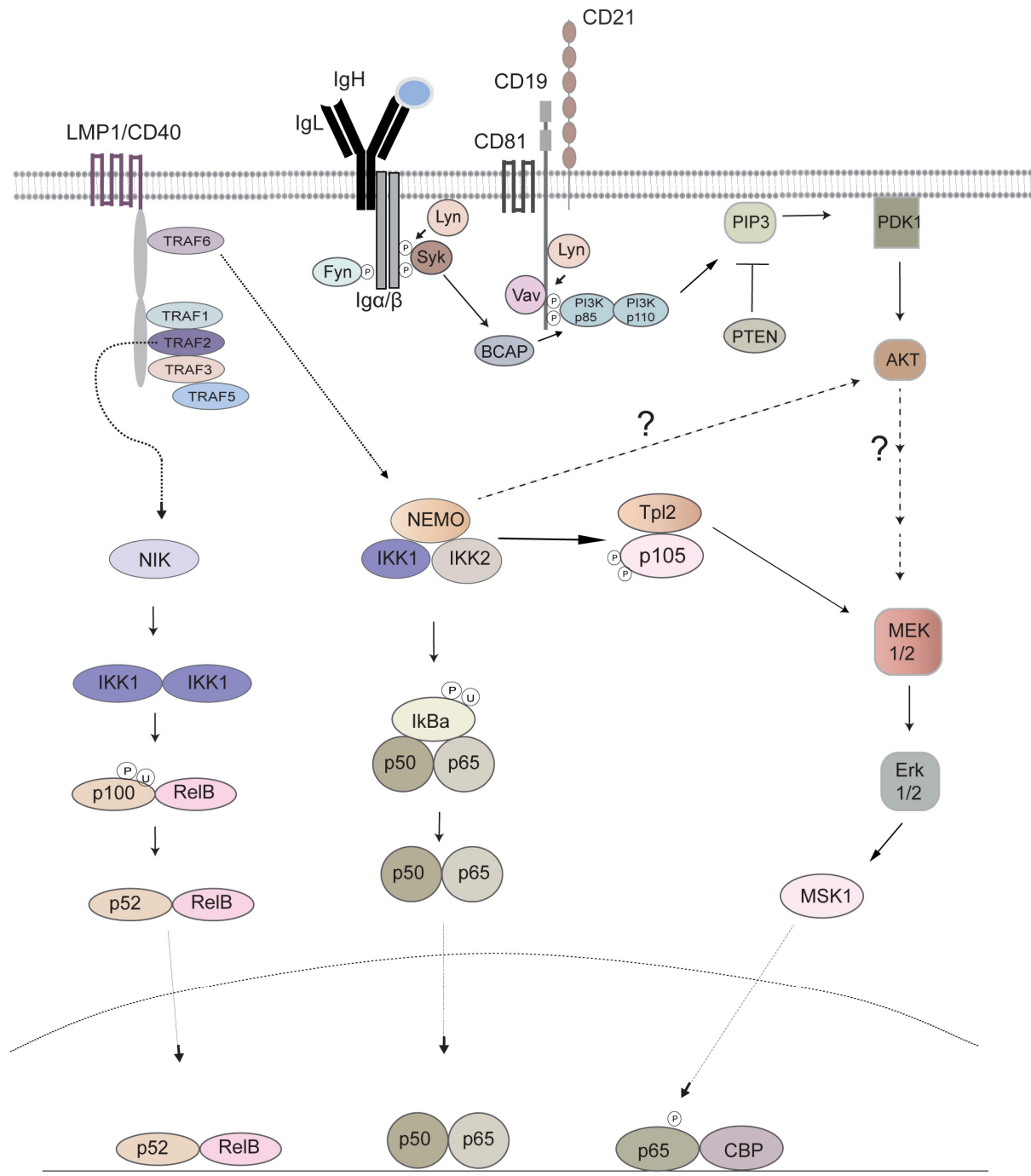


Abbildung 43 Arbeitsmodell für das LMP1/CD40-Signal in B-Zellen. Bei konstitutivem CD40-Signal in B-Zellen wird p105 vom IKK-Komplex phosphoryliert. Das daran gebundene Tpl2 wird nach p105-Degradation frei und kann über Mek → Erk phosphorylieren. Gleichzeitig kann CD19 über PI3K → Akt → Mek auch Erk phosphorylieren. Über einen noch unbekannten Weg sind Nemo und Akt miteinander verbunden. Dieser Signalweg könnte für die B-Zell-Expansion, -Aktivierung und -Überleben verantwortlich sein. Ig (Immunglobulin), H (schwere Kette), L (leichte Kette), TRAF (TNF receptor associated factor), JAK (Janus kinase), NIK (nuclear κ B inducing kinase), IKK (IkB kinase), IkB α (Inhibitor of κ B α), P (phosphorylation), PI3K (Phosphoinositol 3 kinase), Erk (extracellular signal regulated kinase), BCAP (B cell adaptor for PI3K), Btk (Bruton's Tyrosinkinase), PIP3 (Phosphatidylinositol-trisphosphat).

5 Zusammenfassung

Um zu untersuchen, ob konstitutive CD40-Signale in B-Zellen zu Tumoren führen, wurde in unserer Arbeitsgruppe der konditionale transgene Mausstamm LMP1/CD40 generiert (Homig-Holzel et al., 2008). Das Fusionsprotein LMP1/CD40 vermittelt, aufgrund von Eigenaggregation, Liganden-unabhängig ein konstitutiv aktives CD40-Signal. Die B-zellspezifische Expression von LMP1/CD40 führte zu einer B-Zell-Expansion in der Milz und in den Lymphknoten. Die LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen haben einen aktivierten Phänotyp, der durch eine konstitutive Aktivierung der MAPK Jnk und Erk sowie eine selektive Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs hervorgerufen wird. Mäuse, die älter als ein Jahr sind entwickelten mit einer relativ hohen Inzidenz (60%) B-Zell-Lymphome. Ich habe in meiner Arbeit untersucht, inwiefern der nicht kanonische NF- κ B Signalweg eine Rolle in der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Expansion spielt. Hierfür wurden die LMP1/CD40-Mäuse mit Mäusen gekreuzt, in denen B-zellspezifisch Gene des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs (RelB und IKK1) deletiert werden.

Das Milzgewicht und die B-Zellzahlen von RelB//LMP1/CD40-Mäusen waren vergleichbar mit denen von LMP1/CD40-Mäusen. Die Inaktivierung von IKK1 in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen führte zu einer Reduktion des Milzgewichts und der B-Zellzahlen, wobei die B-Zellzahlen im Vergleich zu Kontrollmäusen immer noch erhöht waren. Die Inaktivierung von RelB hatte keinen und die von IKK1 nur einen geringen Einfluss auf die verstärkte Proliferation und das verbesserte Überleben der LMP1/CD40-B-Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs keinen starken Einfluss auf die B-Zell-Expansion in LMP1/CD40-Mäusen hat.

Die Deletion von RelB beeinflusste zwar die Marginalzonen(MZ)-B-Zellzahl nicht, jedoch schienen die MZ-B-Zellen im Vergleich zu LMP1/CD40-Mäusen vermehrt in die Marginalzone zu wandern. Außerdem waren nach RelB- oder IKK1-Inaktivierung wieder vermehrt reife B-Zellen im Knochenmark und B1-Zellen im Peritoneum vorhanden. Hingegen waren im Lymphknoten die B-Zellzahlen geringer. Die verstärkte Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen scheint somit einen Einfluss auf das Migrationsverhalten LMP1/CD40-exprimierender B-Zellen

zu haben. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass nach Inaktivierung von IKK1 und RelB der partielle Block in der B-Zell-Entwicklung, der in LMP1/CD40-Mäusen zu beobachten war, aufgehoben wurde. Diese Daten implizieren, dass der partielle Block in der B-Zell-Entwicklung in LMP1/CD40-Mäusen durch die konstitutive Aktivität des nicht kanonischen NF- κ B Signalwegs verursacht wird.

LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen sind nicht fähig nach TD-Immunisierung eine Keimzentrumsreaktion zu durchlaufen. Da wir beobachtet haben, dass RelB-defiziente LMP1/CD40-B-Zellen zur spontanen Bildung von T_{fh}-Zellen führen, habe ich die Immunantwort der RelB//LMP1/CD40- und IKK1//LMP1/CD40-Mäuse untersucht. Nach TD-Immunisierung bildeten die LMP1/CD40-Mäuse auch nach RelB- oder IKK1-Deletion keine Keimzentren aus. Jedoch war die extrafollikuläre Immunantwort in den RelB//LMP1/CD40-Mäusen wieder auf Kontrollniveau. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass (I) konstitutiv aktivierte B-Zellen zur Bildung von T_{fh}-Zellen führen, (II) RelB in B-Zellen mit konstitutivem CD40-Signal die T_{fh}-Zell-Bildung unterdrückt und (III) RelB einen negativen Einfluss auf die extrafollikuläre Immunantwort nach TD-Immunisierung hat.

Außerdem konnte ich zeigen, dass in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen die Nemo-abhängige Erk-Phosphorylierung über die Tpl-2-Kinase stattfindet und dass PI3K über Akt für die Erk-Phosphorylierung wichtig ist.

6 Material

6.1 Mausstämme

(I) CD19-cre, auch CD19cre (Rickert et al., 1997): Der C57BL/6 Mausstamm hat die Sequenz für die Cre-Rekombinase in den *Cd19*-Lokus inseriert, was die Zerstörung des *Cd19*-Gens verursacht. Die Expression der Cre-Rekombinase ist somit abhängig vom CD19-Promotor.

(II) RelB^{flx/flx}, auch RelB^{fl/fl} (Riemann et al., Manuskript in Vorbereitung): In diesem Mausstamm ist das *RelB*-Gen mit loxP-Stellen 3' und 5' vom Exon 4 flankiert (RelA-homologe Domäne), sodass es durch Cre-Rekombinase zur Exzision von Exon 4 kommt und somit auch zum Verlust des RelB-Proteins.

(III) LMP1/CD40^{fl/STOPP} (Homig-Holzel et al., 2008): Das transgen LMP1/CD40 ist in den *rosa26*-Lokus inseriert. Eine mit loxP-Sequenzen flankierte STOPP-Kassette stromaufwärts von der Sequenz für LMP1/CD40 verhindert die Expression des Transgens und wird in Anwesenheit von der Cre-Rekombinase entfernt. Nach Exzision der STOPP-Kassette wird LMP1/CD40 unter dem endogenen Rosa26-Promotor exprimiert.

(IV) IKK1^{flx/flx} auch IKK1^{fl/fl} (Gareus et al., 2007): In diesem Mausstamm ist das *IKK1*-Gen mit loxP-Stellen 3' und 5' von Exon 6 bis 8 flankiert. Mit Hilfe der Cre-Rekombinase wird der Bereich von Exon 6 bis 8 deletiert und somit entsteht ein IKK1-null-Allel und es kommt zu keiner Expression des IKK1-Proteins.

6.2 Enzyme und dNTP's

Taq-(*Thermus aquaticus*) DNS-Polymerase wurde von Invitrogen Life Technologies verwendet. Proteinase K wurde von Sigma bezogen.

6.3 Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller	Spezifität
Tpl2	Merck	Tpl2
AKT8	Calbiochem	Akt
Ro 31-8220	Sigma-Aldrich	MSK-1

6.4 Primer

Primer Name	Primer Sequenz 5'-3'
CD19c	AACCAGTCAACACCCTTCC
CD19d	CCAGACTAGATACAGACCAG
CD40PCR3	CTGAGATGCGACTCTCTTTGCCAT
Cre7	TCAGCTACACCAGAGACGG
Ex1Fw1LMP1	AGGAGCCCTCCTTGTCTCTCTA
Rosafw1(60)	CTCTCCCAAAGTCGCTCTG
Rosarev2-62	TACTCCGAGGCGGATCACAAGC
RelB-GT1	AGG TTG ATG GTA ACT TTG GAT G
SeqTVRelB1	TCC AAA AAA ACC AAA CCA ACA AC
SeqTVRelB8	GTT TTC CCT GCT TGG TTC TGC
Ikk1FL-U	CGCTTAGTGTGACTGAGGAAC
Ikk1FL-L	ATGAGCCCAACATTTAATCTT
Ikk1D-U	GGCATCAGAGTCCGTGGGT

6.5 Antikörper

Antikörper für durchflusszytometrische Färbungen Fluorochrom gekoppelte Antikörper spezifisch für AA4.1, B220, CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD21, CD23, CD43, PNA, NP7, ICAM, CD95, IgD, CXCR4, CXCR5, ICOS-L, PD-L1, PD-1, IgG1 und IgM wurden entweder von BD Bioscience oder eBioscience bezogen.

I) Antikörper für Western-Blotting

Antigen	Hersteller	Quelle	kDa	Verdünnung	Dilutant 4ml
Akt	#9272 Cell Signaling	Kaninchen	60	1:1000	TBST , 5% BSA
p-Akt	#4058 Cell Signaling	Kaninchen	60	1:1000	TBST , 5% BSA
cRel	#sc-6955 Santa Cruz	Maus	75	1:500	TBST , 5% BSA
Erk	#9102 Cell Signaling	Kaninchen	44/42	1:1000	TBST , 5% BSA
IκBa	#sc-371 Santa Cruz	Kaninchen	33	1:1000	TBST , 5% BSA
Jnk	#9258 Cell Signaling	Kaninchen	46/54	1:1000	TBST , 5% BSA
Lamin B	#sc-6217 Santa Cruz	Ziege	67	1:500	TBST, 5% BSA
MEK1,2	#9122 Cell Signaling	Kaninchen	45	1:1000	TBST , 5% BSA
p50p105	#sc-1190 Santa Cruz	Ziege	50/100	1:500	TBST , 5% BSA
p52p100	#2882 Cell Signaling	Kaninchen	52/100	1:1000	TBST , 5% BSA
pp65	#sc-101749 Santa Cruz	Kaninchen	65	1:500	TBST , 5% BSA
p65	#4764 Cell Signaling	Kaninchen	65	1:1000	TBST , 5% BSA
pErk	#9101 Cell Signaling	Kaninchen	44/42	1:1000	TBST , 5% BSA
plkba	#9246 Cell Signaling	Maus	33	1:1000	TBST, 5% Milch
pJnk	#ab4821abcam	Kaninchen	46/54	1:500	TBST , 5% BSA
pMEK1,2	#9154 Cell Signaling	Kaninchen	45	1:1000	TBST , 5% BSA
RelB	#4954 Cell Signaling	Kaninchen	70	1:1000	TBST , 5% BSA
Tubulin	#2148 Cell Signaling	Kaninchen	55	1:0000	TBST , 5% BSA
IKK1	#2682 Cell Signaling	Kaninchen	85	1:1000	TBST , 5% BSA

II) Zweitantikörper

Spezifität	Hersteller	Verdünnungsfaktor	Verdünnungslösung
Kaninchen	Cell Signaling	1:2000	TBST,5% (w/v) Milchpulver
Maus	Cell Signaling	1:2000	TBST,5% (w/v) Milchpulver
Ziege	Kulturüberstand	1:20000	TBST,5% (w/v) Milchpulver

III) Antikörper für Immunhistochemie

Antigen	Quelle	Gekoppelt an	Verdünnungsfaktor	Hersteller
Maus CD3	Hund		1:2	Gefälligkeit von E. Kremmer
Maus IgM	Ziege	Peroxidase	1:100	Sigma
Maus MOMA-1	Ratte		1:100	Biomedicals
PNA	Ratte	Biotin	1:2000	Vector
Ratten IgG2	Maus	Biotin	1:250	Jackson Laboratories

IV) Antikörper für ELISA und ELISPOT

- IgM, II/41; IgG1, A85-3; (Fa. BD Bioscience)
- Für NP-spezifische ELISAs: NP₁₇-BSA und NP₃-BSA (Fa. Biosearch Technologies)
- Biotinylierte sekundäre Antikörper: IgM-Bio, R6-60.2; IgG1-Bio, A85-1; (Fa. BD Bioscience)
- Streptavidin-gekoppelte Alkaline Phosphatase (Fa. Vector)

6.6 Verbrauchsmaterial

Wenn nicht anders angemerkt, wurden die verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Becton-Dickinson, BioRad, Calbiochem, Corning, Eppendorf, GE-Healthcare, Greiner, Fermentas, Invitrogen, Merck, Millipore, Miltenyi Biotec, New England Biolabs, Neolab, Nunc, PAA, Pan Biotech, Promega, Qiagen, Roche, Sartorius, Sigma-Aldrich und Stratagene bezogen.

6.7 Software

Adobe Illustrator CS5

Adobe Photoshop CS5

Microsoft Excel++

Microsoft Word

CELLQuest Beckton Dickinson

Endnote 9

Epson Scanner program

FlowJo

ImageJ

6.8 Geräte

Brutschrank (Heraeus, ThermoForma, Binder)

Cryostat CM1900 UV (Leica)

Elektrophoresekammer (Biometra, BioRad)

ELISA-Reader (Tecan-Sunrise)

FACS Calibur (Becton-Dickinson)

Falcon Roller (Coulter Electronics Limited)

Gefrierschrank -80°C (Colora)
Gefrierschrank -20°C (Liebherr)
Kühlschrank (Liebherr)
Lichtmikroskop (Zeiss)
Millipore-Anlage (Millipore)
Netzgerät (BioRad)
Neubauer-Zählkammer (GLW)
PCR-Thermozykler (Perkin Elmer, Biometra)
pH-Messgerät (Knick)
Pipetten (Eppendorf)
Pipettierhilfe (Integra)
Spektrophotometer (Eppendorf)
Sterilbank (Bio Flow Technik)
UV-Transilluminator (UVP-Inc.)
Vortexer Genie (Bender & Hobein)
Western-Blot-Apparatur (BioRad)
Zentrifugen (Eppendorf, Sorvall, Beckman, Hettich)

7 Methoden

7.1 Analyse von transgenen Mäusen

7.1.1 Maus-Verpaarungen

LMP1/CD40^{fl/STOP}//CD19-cre-Mäuse (balb/c Hintergrund) wurden aus der Verpaarung von LMP1/CD40^{fl/STOP} Mäusen (Homig-Holzel et al., 2008) und CD19-cre Mäusen (C57BL/6 Hintergrund) (Rickert et al., 1997) erhalten (hier als LMP1/CD40-Mäuse bezeichnet). Die Nachkommen haben einen Mix-background. LMP1/CD40^{fl/STOP}-Mäuse beinhalten ein chimäres *LMP1/CD40*-Gen, welches hinter den *Rosa26*-Lokus geschaltet ist. Eine loxP-flankierte STOPP-Kassette befindet sich stromaufwärts und wird durch eine Cre-Rekombinase entfernt. Bei dem CD19Cre Mausstamm befindet sich die CD19Cre-Rekombinase im CD19-Lokus (C57BL/6), wobei dessen Expression durch den Promotor des *Cd19*-Gens reguliert wird und es zur gleichen Zeit zur Deletion des CD19-Gens kommt. Um einen RelB- oder IKK1-defizienten LMP1/CD40//CD19-cre-Mausstamm zu generieren, wurden konditionale RelB^{fl/fl}- oder IKK1^{fl/fl}-Mäuse mit LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen verpaart. Wenn nicht anderes vermerkt wurde, wurden die Mäuse im Alter von 8 bis 16 Wochen analysiert. Alle Mäuse wurden unter speziellen Pathogen-freien Bedingungen gehalten und gezüchtet. Alle Experimente wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt und vorab durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

7.1.2 Präparation primärer Lymphozyten aus der Maus

Die Mäuse wurden für die Analyse zunächst mit CO₂ euthanasiert und anschließend die Organe präpariert. Organe wie Milz und Lymphknoten wurden als Ganzes entnommen und in ein B-Zell-Medium (RPMI 1640 (Gibco), 1 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (Biochrom KG), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (Pen/Strep Gemisch), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 50 µM β-Mercaptoethanol, 1 x nicht-essenzielle Aminosäuren, alle von Gibco) bis zur weiteren Verwertung gehalten. Um die Lymphozyten aus dem Gewebeverband zu bekommen, wurden diese durch ein feines Sieb (70 µM, Beckton Dickinson) gedrückt.

Der Schienbeinknochen (Tibia) wurde freigemacht, angeschnitten und mittels einer feinen Kanüle und einer Spritze mit 7 ml B-Zell-Medium ausgespült. Um die B-Zellen aus dem Bauchraum zu gewinnen, wurde dieser mit 7 ml B-Zell-Medium durchgespült. Bei blutreichem Gewebe, wie der Milz, Lymphknoten und dem Knochenmark, wurde eine Erythrozyten-Lyse (1x RBC Lysis Buffer, eBioscience) vorgenommen. Hierfür wurden die Zellen vorerst 10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1-2 ml Lysepuffer gelöst. Die Reaktion erfolgte für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde mit 9 ml 1%igen-B-Zell-Medium die Reaktion gestoppt und anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1200 rpm; 4°C; 10 Min.). Während der gesamten Analyse, außer bei der Erythrozyten-Lyse, wurden die Zellen auf Eis gehalten. Die Gewinnung der B-Zellen erfolgte durch „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-Separation-Kit (Miltenyi Biotec).

7.1.3 Isolierung reifer B-Zellen aus der Milz

Mittels magnetisch-gekoppelten CD43-Antikörpern erfolgte die Isolierung der B-Zellen. Die magnetisch gekoppelten CD43-Antikörper die an CD43-nicht-B-Zellen binden, sind in der LS-Säule am Magneten hängen geblieben, während die reifen B-Zellen durchlaufen konnten und somit als Negativ-Fraktion gesammelt wurden. Die isolierten Zellen waren zu 85 bis 95 % reife B-Zellen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die B-Zellen nicht von Antikörpern gebunden werden und somit deren mögliche Aktivierung verhindert wird.

7.1.4 Immunisierung von Mäusen

Für die Immunisierung wurde den Mäusen, im Alter von 8 bis 12 Wochen, 100 µg des Antigens NP-chicken-gammaglobulin (NPCGG, ein 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl Hapten, Biosearch Technologies) interperitoneal gespritzt. NP-CGG wurde für die Verbesserung der Immunreaktion vor der Immunisierung mit Kaliumaluminiumsulfat gefällt. Für die Präzipitation wurde ein Volumen des Antigens mit einem Volumen KAl(SO₄)₂-Lösung (10 %) gemischt und mit 1 N NaOH auf pH 6,5 eingestellt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten auf Eis und anschließend wurde das Antigen für 10 Minuten bei 1600 x g (4200 rpm, Minifuge Sigma) zentrifugiert. Danach wurde das Antigen dreimal mit sterilem PBS gewaschen und nach jedem Waschschrift nochmal zentrifugiert. Schließlich wurden 50 µg jedes Antigens in 200 µl sterilem PBS

resuspendiert und den Mäusen intraperitoneal gespritzt. An Tag 0 und 7 wurde den Mäusen Blut abgenommen um die NP-spezifischen Immunglobulin-Titer zu verfolgen. Mäuse wurden 14 Tage nach Immunisierung präpariert und analysiert.

7.1.5 Präparation vom Blutserum aus Mäuseblut

Für die Gewinnung von Seren wurde den Mäusen vor und 7 Tagen nach der Immunisierung Blut von der Schwanzvene entnommen. 14 Tage nach Immunisierung oder auch bei der Analyse unimmunisierter Tiere, wurde das Blut direkt aus dem Herzen entnommen. Das Blut wurde für mindestens drei Stunden zum Gerinnen auf Eis inkubiert und anschließend bei 15.000 x g (13.000 rpm) bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das sich im Überstand befindende Serum abgenommen und der Blutkuchen verworfen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, um ein möglichst sauberes Serum zu gewährleisten.

7.1.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mittels dieser Methode kann die Serumkonzentration von sezernierten Antikörpern mit einer bestimmten Antigenspezifität und/oder einem bestimmten Immunglobulin-Isotyp bestimmt werden. Hierfür werden die entsprechenden Antigene, bzw. Isotyp-spezifischen Antikörper an eine 96-Lochplatte gekoppelt. Die Platten werden anschließend mit den zu untersuchenden Seren in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Die spezifisch gebundenen Antikörper können dann mit Hilfe von biotinylierten Immunglobulin-Isotyp-spezifischen Antikörpern und einer Streptavidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase in einer enzymatischen Farbreaktion quantifiziert werden.

7.1.7 Bestimmung der NP-spezifischen Immunglobulintiter

Um NP-spezifische Antikörper nachzuweisen (niedrig- und hochaffine) wurden die 96-Lochplatten (Maxisorb, Nunc) mit 5 µg/ml NP₁₇-BSA (Biosearch Technologies) und für den Nachweis hochaffiner Antikörper mit 5 µg/ml NP₃-BSA (Biosearch Technologies) beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, (PBS-M; 1 % (w/v) Milch in Phosphat-gepufferter Salzlösung) wurden die Platten für 30 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Seren in verschiedenen Verdünnungen in PBS-M aufgetragen.

Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei RT wurde anschließend dreimal mit PBS gewaschen und je nach Isotyp der biotinylierte sekundäre Antikörper (IgM-Bio, R6-60.2; IgG1-Bio, A85-1, alle von BD Bioscience) zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen der Platten mit PBS wurde Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase (SA-AP) verdünnt (1:2000 in 0,1 M NaHCO₃ Puffer (pH 9,2)) auf die Platten gegeben. Nach 30 Minuten wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Anwesenheit der Phosphatase durch Zugabe von O-Phenyldimine (Sigma) in 0,1 M Zitronensäure-Puffer mit 0,015 % (v/v) H₂O₂ als Substrat nachgewiesen. Die auftretende Farbreaktion wurde bei 405 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesers (Photometer Sunrise RC, Tecan) gemessen. In dieser Arbeit wurden NP-spezifische Antikörper mit den Isotypen IgM und IgG1 bestimmt. Zur Quantifizierung der α -NP-spezifischen IgM- und IgG1-Antikörper-Titer erfolgte durch die Standardisierung auf das Serum einer immunisierten Kontrollmaus. Die Titer wurden in relativen Einheiten angegeben.

7.1.8 Elispot

Am Vortag der Mausanalyse wurden Filterplatten (HA, Clear Plates, 0,45 μ M Surfactant-Free, Mixed Cellulose, Ester Membrane) mit den entsprechenden NP₃- und NP₁₇-BSA (1:400) in 0,1 M NaHCO₃-Puffer (pH 9,2) unter sterilen Bedingungen beschichtet. Am Tag der Mausanalyse wurden die Platten dreimal mit sterilem PBS (100 μ l/Loch) gewaschen und anschließend mit 10 %-igen B-Zellmedium blockiert (150 μ l/Loch). Der Blockierungsschritt erfolgte für mindestens 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Feuchtigkeit. 5 x 10⁵ Zellen (exakt gezählt) wurden pro Loch (in 100 μ l) auf die Platte pipettiert und für ein bis zwei Tage im Brutschrank kultiviert. Danach wurde das Blockmedium entfernt und die Platten 6 mal mit PBS/0,01 % Tween20 gewaschen. Anschließend wurde in jedes Loch 100 μ l des entsprechenden biotinylierten Antikörpers (IgM-Bio, R6-60.2; IgG1-Bio, A85-1), 1:500 in PBS/1 % BSA verdünnt, gegeben und für 2 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Feuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten erneut 6 mal mit PBS/0,01 % Tween20 gewaschen. Anschließend wurde den Platten jeweils 50 μ l/Loch die 1:2000 in PBS/1 % BSA verdünnte Streptavidin-gekoppelte Alkaline Phosphatase zugegeben und für 45 Minuten bei RT inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift durch 3-maliges Waschen mit PBS/0,01 % Tween20 und dann mit 3-maligem Waschen mit PBS. Es wurde pro Platte 1 Tablette

DAB-Peroxidase-Substrat und 1 Tablette UREA H_2O_2 in 5 ml H_2O gelöst und filtriert ($0,45 \mu\text{M}$). Zum Entwickeln wurden von der Lösung 50 μl /Loch auf die Platte pipettiert. Nach ca. 5 Minuten waren die Spots zu erkennen und die Reaktion wurde unter fließendem H_2O gestoppt. Die Anzahl der Spots konnte mit Hilfe des EliSpot-Readers gelesen werden.

7.1.9 Immunhistochemie von Gefrierschnitten

Möglichst innerhalb kurzer Zeit nach Präparation wurden die Milzen in O.C.T. Tissue Tek (Sakura) eingelegt und zum Gefrieren auf Trockeneis gestellt. Anschließend wurden die eingebetteten Organe bei -80°C gelagert. Für die Färbungen wurden 4-8 μm dicke Schnitte mit einem Kryotom (Leica Microsystems) angefertigt und diese danach über Nacht luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in 100 % Aceton (v/v) fixiert und danach wurden sie erneut für 20 Minuten getrocknet. Die Schnitte wurden dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen, um das TissueTec vom Gewebe zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten mit Blocklösung (10 % (v/v) Ziegenerum, 0,1 % (v/v) H_2O_2 , 1 % (w/v) BSA in PBS) bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte nochmals mit zwei verschiedenen Blocklösungen (Avidin/Biotin Blocking Kit von Vector Laboratories) je 15 Minuten lang inkubiert. Dies dient zur Blockierung unspezifischer Biotin- oder Avidin-Bindestellen. Zwischen den beiden Vorgängen wurde jeweils drei Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die verschiedenen Antikörper je eine Stunde bei RT inkubiert und zwischen den verschiedenen Antikörper-Inkubationsschritten wurde jeweils drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Histoschnitte noch mit Streptavidin gekoppelter Phosphatase (Sigma), verdünnt bei 1:400 in PBS, für 30 Minuten inkubiert und nochmals gewaschen. Streptavidin-gekoppelte Antikörper wurden mit Hilfe des Alkalische Phosphatase Substrat-Kit III (Vector Laboratories) in Blau und Peroxidase-gekoppelte Antikörper durch eine Reaktion mit 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories) in Rot angefärbt. Die Farbreaktionen wurden durch Waschen der Schnitte in PBS gestoppt, die gefärbten Präparate danach getrocknet, anschließend mit Gelatine (Kaisers Gelatine, Merck) eingebettet bevor sie mit einem Deckgläschen versehen wurden.

Die Aufnahmen der Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena) untersucht, mit einer Digitalkamera (RS Photometrics) aufgenommen und im Programm Openlab von Improvision und Adobe Photoshop Software gesichert.

7.1.10 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Zellen wurden zuerst mit MACS-Puffer (PBS; 1% BSA) gewaschen, um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden sie mit einer Kombination von FITC-, PE-, PerCP- und APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gefärbt, die in MACS-Puffer verdünnt waren. Es wurde jeweils 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen für 20 Minuten mit dem jeweiligen Färbemix gefärbt und dann nochmals in MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in MACS-Puffer für die Analyse aufgenommen. Bei Färbungen mit FITC, PE und PerCP wurde, falls erforderlich, zusätzlich TOPRO-3 bei einer Endverdünnung von 1:40.000 (Molecular Probes) zugegeben, um die toten Zellen anzufärben. TOPRO-3 wurde 1:200 vorverdünnt und anschließend für den Gebrauch nochmals 1:200 verdünnt. Mit Hilfe von TOPRO-3 können tote Zellen (TOPRO-3 positiv) aus einer Zellpopulation ausgeschlossen werden. Alle Analysen wurden mit einem FACSCalibur™ (BD Biosciences) durchgeführt und die Resultate mit der CELLQuest™ Software oder FlowJo ausgewertet. Es wurden je nach Färbung zwischen 3×10^4 und 5×10^5 lebende Zellen aufgenommen, die sich innerhalb des „Lymphozyten-Fensters“, welches durch eine bestimmte Größe der Zellen und die lichtbrechenden Eigenschaften dieser definiert ist, befanden. Je nach Organ, kann die „Fenstergröße“ variieren, da z.B die B1-Zellen des Peritoneums größer sind und sich außerhalb des Lymphozyten-Fensters befinden.

Besondere Färbung mit CXCR5

Um die T-follikulären Helferzellen im FACS zu detektieren, wurden die Milzzellen mit α CXCR5-, α PD-1- und α CD4-Antikörpern gefärbt. Das Besondere bei diesem Färbemix ist, dass die Milzzellen vorerst nur mit α CXCR5-Antikörper für 1 h bei 4°C inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen einmal mit MACS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem CD4-PD-1-Färbemix für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Als gut-funktionierende α CXCR5-Antikörper haben sich α CXCR5-FITC und α CXCR5-Bio der Firma BD Bioscience erwiesen.

7.1.11 Intrazelluläres FACS

Mit dieser Methode war es möglich innerhalb der verschiedenen Zell-Populationen bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Bcl-6 oder Proteine, phosphoryliert oder unphosphoryliert zu untersuchen. Für das intrazelluläre FACS wurden mindestens 2×10^6 Zellen/Loch (96 Lochplatten, Rundboden) mit dem Kit von BD Bioscience (BD Cytofix/Cytoperm™) verwendet. Vorerst wurden die Oberflächenmarker, wie in Abschnitt 7.1.10 beschrieben, angefärbt. Danach wurden die Zellen in 100 µl fixation/permeabilization-Puffer schnell und stark resuspendiert und abgedunkelt für eine Stunde oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in den Platten für 5 Minuten abzentrifugiert (1200 rpm, 4°C). Danach erfolgte ein Waschschriff, indem 100 µl 1x Permeabilization-Puffer zum Pellet zugegeben wurde. Der 10x Permeabilizations-Puffer wurde vorher 1 zu 10 mit H₂O verdünnt. Sollten die Proteine, wie z.B. Erk, Jnk, Il-6 untersucht werden, so wurden die Zellen mit dem Erst-Antikörper für 30 Minuten abgedunkelt und bei RT inkubiert. Der Antikörper war derselbe, der auch für die Western-Blot-Experimente verwendet wurde (6.1.5 I) und wurde für das intrazelluläre FACS 1:50 im 1x Permeabilizations-Puffer verdünnt. Nach der Inkubation mit dem Erst-Antikörper wurde den Zellen 100 µl 1x Permeabilizations-Puffer zugegeben und zentrifugiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschriff. Da die Western-Blot-Antikörper nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, wurden die Zellen mit einem Zweit-Antikörper (anti-Rat-PE) 1:100 in 1x Permeabilizations-Puffer verdünnt und für 30 Minuten abgedunkelt bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten, wie nach der Inkubation mit dem Erst-Antikörper, zwei Waschschriffe und nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in MASC-Puffer aufgenommen und mittels dem FACSCalibur™ (BD Biosciences) analysiert. Die Resultate wurden mit der CELLQuest™- oder FlowJo-Software ausgewertet.

7.2 Molekularbiologische Methoden

7.2.1 DNA präparative Techniken

7.2.1.1 DNA Isolation aus Mausschwanzspitzen

Die DNA-Isolierung aus den Mausschwanzspitzen erfolgte nach einer abgewandelten Methode nach Laird (Laird et al., 1991). Den Mäusen wurde ein etwa 0,3 cm langes Schwanzstück abgeschnitten und über Nacht schüttelnd in 500 µl Lysepuffer (Tris/HCl

pH 8, (100 mM); EDTA (5 mM); SDS (0,2 %); NaCl (200 mM); 100µg/ml Proteinase K) bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde zur Proteinfällung 170µl an 5 M NaCl-Lösung zugegeben und nach mehrmaligem Invertieren 10 Minuten lang bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, welches mit 600µl 100%iges-Isopropanol zur DNA-Fällung vorgelegt wurde. Danach wurde der Ansatz bei 15.000 rpm 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70%-igen Ethanol gewaschen und bei 15.000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die DNA wurde in einem Heizblock bei 37°C getrocknet und danach in 100µl TE-Puffer gelöst.

7.2.1.2 Techniken der DNA-Analyse

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985) wurde für die Genotypisierung der transgenen Mäuse verwendet. Hierzu wurde genomische DNA verwendet, die, wie unter 7.2.1.1 beschrieben, aus Schwanzzellen der Mäuse isoliert wurde. Die Magnesium-Konzentration der Reaktionsansätze sowie das PCR-Programm wurden je nach Primer-Paar gewählt.

Programm

Genotypisierung der RelB^{fl/fl}- und IKK1^{fl/fl}-Mäuse:

PCR-Reaktion für RelB ^{fl/fl}			PCR-Reaktion für IKK1 ^{fl/fl}		
DNA	2 µl		DNA	1 µl	
H ₂ O	15,85 µl		DMSO	1 µl	
DMSO	1 µl		H ₂ O	22,1 µl	
TaqPuffer	2,5 µl		TaqPuffer	2,5 µl	
MgCl ₂ (50mM)	1,5 µl		MgCl ₂ (50mM)	1,5 µl	
dNTPs (10mM)	0,5 µl		dNTPs (10mM)	1,25 µl	
Primer RelB-GT 1 (25µM)	0,5 µl		IKK1FL-U	0,5 µl	
Primer SeqTVRelB1 (25µM)	0,5 µl		IKK1D-U	0,5 µl	
Primer SeqTVRelB8 (25µM)	0,5 µl		IKK1FL-L	0,5 µl	
TaqPol	0,15 µl		TaqPol	0,15 µl	

PCR Programm:			PCR Programm:		
Starttemperatur	95°C	4 min	Starttemperatur	95°C	30 s
Zyklische Denaturierung	94°C	45 s	Zyklische Denaturierung	94°C	30 s
Hybridisierung	58°C	45 s	Hybridisierung	55°C	30 s
Verlängerung	72°C	45 s	Verlängerung	72°C	60 s
Finale Verlängerung	72°C	10 min	Finale Verlängerung	72°C	2 min
Zyklenzahl: 35			Zyklenzahl: 34		

Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese wurde nach Sambrook (Sambrook and Russell, 2006) durchgeführt, um PCR-Produkte aufzutrennen und sichtbar zu machen. Agarosegele enthielten 1 x TAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,5), 5 µg/ml Ethidiumbromid und 1 bis 2 % (w/v) Agarose. Die Elektrophorese wurde in einer Gelelektrophorese-Kammer (Peqlab) mit 1 x TAE Puffer bei 80 bis 100 V für 1 bis 2 Stunden durchgeführt.

7.2.2 Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen

7.2.2.1 Präparation von Proteinen aus Zellen

Für die Isolierung der Zellproteine wurden ca. $2\text{-}5 \times 10^6$ B-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 20 µl 2-fachem NP40 - Extraktionspuffer (100 mM Tris pH 7,4, 300 mM NaCl, 4 mM EDTA, 2 % (v/v) NP40) aufgenommen. Dem NP-40 Puffer wurden Protease (1:5)- und Phosphatase-Inhibitoren (1:50) zugegeben (Mini Complete Tabletten, Roche Diagnostics; und Halt Phosphatase-Inhibitor Cocktail, Pierce), um die Degradation durch Proteasen und die Dephosphorylierung durch Phosphatasen der Proteine zu minimieren. Um die Zellen zu lysieren wurden die Proben 5 x abwechselnd für jeweils 5 Minuten auf Eis inkubiert und für ein paar Sekunden auf höchster Stufe mehrmals gevortext. Danach wurde der Proteinextrakt von den Zelltrümmern und DNA getrennt, indem das Lysat bei maximaler Umdrehungszahl für 15 Minuten zentrifugiert (4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde.

7.2.2.2 Kernfraktionierung

Für die Kernfraktionierungen wurden 2×10^7 Zellen für 15 Minuten in 100µl Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCL; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1x Protease-Inhibitor) auf Eis inkubiert. Anschließend wurde den Proben jeweils 6,25 µl 10% IgePal hinzugegeben und die Proben für 5 Minuten bei 4°C auf dem Vortexer geschüttelt. Danach wurde der Ansatz bei 15.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um die Kerne zu sedimentieren. Der Überstand enthielt die zytoplasmatische Fraktion und wurde in ein Eppi überführt und bei -80°C aufbewahrt. Die Kerne wurden in 1,5 ml Puffer A gewaschen und nach Zentrifugation wurde das Pellet mit 40 µl Puffer C (20 mM HEPES pH 7,9; 0,4 M NaCl; a mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1x Protease- Inhibitor) für die Lyse der Kerne versetzt. Danach wurden die Proben 30 Minuten bei 4°C im

Vortexer geschüttelt und anschließend 15 Minuten bei 4°C und 15000rpm abzentrifugiert. Im Überstand befand sich die nukleäre Fraktion und wurde bei -80°C aufbewahrt.

7.2.2.3 Proteinquantifizierung und Probenvorbereitung

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad. Nach der Proteinquantifizierung wurde eine bestimmte Menge Extrakt (meist 15-25 µg Protein) mit 5 x Laemmli Probenpuffer (300 mM Tris pH 6,8 , 7,5 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (v/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) β- Mercaptoethanol) versetzt (Endkonzentration 1 x), bei 70°C für 10 Minuten erhitzt und somit denaturiert. Die Extrakte wurden meistens direkt am Tag der Präparation weiterverwendet oder für weitere Experimente bei -80°C eingefroren.

7.2.2.4 SDS-PAA-Gelelektrophorese

Bei diese Methode, nach Laemmli (Laemmli, 1970), wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel; 0,1 % SDS) aufgetrennt. Das Acrylamidgel bestand aus einem Sammelgel (5 % (v/v) Acrylamid, 0,625 mM Tris pH 6,8 , 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,006 % (w/v) TEMED), das der Konzentrierung der negativ geladenen Proteine dient und einem Trenngel (10 to 12 % (v/v) Acrylamid, 3,75 mM Tris pH 6,8 , 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,004 % (w/v) TEMED), das die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht. Die verwendeten 10 %igen und 12 %igen Trenngele ermöglichten eine Auftrennung von Proteinen im Bereich zwischen 15- und 180 kDa. Für den Größenvergleich wurde ein Proteinstandard (Prestained Protein Ladder, Fermentas) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde in einer Bio-Rad Vorrichtung bei 250 V und 20 mA (konstant) für das Sammelgel und 40 mA (konstant) für das Trenngel durchgeführt.

7.2.2.5 Western-Blotting

Bei der Western-Blot-Analyse (Towbin, 1970) können die im SDS-PAA-Gel aufgetrennten Proteine durch elektrischen Transfer auf eine Protein-bindende Membran (Polyvinylidenfluorid PVDF; ImmonilonTM Membran, Millipore) übertragen werden. Da das elektrische Feld dabei senkrecht zur vorherigen Trennrichtung angelegt wird, bleibt das Muster der getrennten Proteine auf der Membran erhalten. Es wurde ein sogenannter „Nass-Blot“ in einer Bio-Rad-Apparatur durchgeführt, bei dem die gesamte Blotvorrichtung mit Blotpuffer (25 mM Tris Base, 0,2 M Glyzin, 20 % (v/v) Methanol)

überdeckt ist. Die Proteine wurden mittels elektrischen Stroms auf eine Polyvinyliden-Fluorid (PVDF) Membran (Immobilon™ P Membran, Millipore) bei 60 mA (konstant) und 300 V über Nacht im Kühlraum übertragen. Vor dem Blotvorgang wurde die PVDF-Membran mit Methanol aktiviert, mit Reinstwasser gewaschen und anschließend mit Blotpuffer für den anschließenden Proteintransfer 5 Minuten lang äquilibriert. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls fünf Minuten in Blotpuffer äquilibriert und dann auf drei mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Auf das Gel wurde die PVDF-Membran gelegt und auf diese drei zusätzliche in Blotpuffer getränkte Filterpapiere. Anschließend wurde der Blot zwischen Anode und Kathode der Kammer so angeordnet, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Membran wanderten. Nach dem Transfer wurde die Membran für ca. 8 Min in Ponceau S (Ponceau S Lösung, Sigma) gelegt, und somit die zuvor übertragenen Proteine unspezifisch gefärbt. Mit dieser Methode konnte nach dem Transfer die gelungene Übertragung der Proteine auf die Membran überprüft werden. Die Membran wurde in Wasser gewaschen, bis die Ponceau S Färbung wieder entfernt war und anschließend weiter verwendet.

7.2.2.6 Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörpern

Bestimmte Proteine können mittels spezifischer Antikörper auf der Western-Blot Membran nachgewiesen werden. Der Proteinnachweis erfolgt mit Hilfe zweier Antikörper. Der Erstantikörper bindet spezifisch an das gesuchte Protein und mit Hilfe des Zweitantikörpers, der den Erstantikörper spezifisch bindet, kann das Protein mittels einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht werden. Der Zweitantikörper ist an die Meerrettich-(horseradish)-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol katalysiert. Das oxidierte Luminol emittiert Licht, welches durch die Exposition eines lichtsensitiven Films (CEA RP new) nachgewiesen werden kann. Die Entwicklung des Filmes erfolgte mit Hilfe eines Cawomat 2000 IR processor (beide von Ernst Christiansen). Die Chemolumineszenz wird verstärkt, indem die Oxidation von Luminol durch HRP in Anwesenheit eines chemischen Verstärkers, wie Phenol, durchgeführt wird.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Western-Blot Membranen zunächst in TBST (0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,02 % (v/v) Tween) mit 5 % Rinderserumalbumin (BSA) für 1 Stunde bei RT oder für qualitativ schlechtere Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde mit dem Erstantikörper, der in TBST mit 5 % BSA verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C auf

dem Roller inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper, der in einer 5 % Milchpulver-TBST-Lösung (w/v) verdünnt wurde, für 1 bis 3 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran ebenfalls dreimal für 5 Minuten in TBST gewaschen, um sie von überschüssigen Antikörpern zu befreien. Anschließend wurden mit dem ECL Detektionsreagenz (Enhanced Chemiluminescence ECLTM von GE Healthcare) die gesuchten Proteine sichtbar gemacht.

7.2.2.7 Wiederverwendung eines Western-Blots

Die Membran kann mehrmals auf unterschiedliche Proteine untersucht werden, indem die Antikörper von der Membran entfernt werden. Hierfür wurden die Membranen für 30 Minuten bei 56°C und leichtem Schütteln in einer Waschlösung (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x mit TBST gewaschen und anschließend mit TBST mit 5 % Rinderserumalbumin für mindestens 1 h geschüttelt und somit unspezifische Bindungsstellen abgedeckt. Schließlich wurde die Membran erneut mit einem Erstantikörper über Nacht auf dem Roller inkubiert und am nächsten Tag wie oben beschrieben fortgefahren.

7.3 Zellkultur

7.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Pipetten und Lösungen unter einer Umluft-Sterilbank (Heraeus, Düsseldorf) durchgeführt. Die Zellen wurden, falls nicht anders beschrieben, bei 300 x g (1200 rpm) für 10 Minuten zentrifugiert. Für die Waschschrte wurde steriles PBS (Dulbecco, PAA Laboratories, Linz) verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verschiedenen Zelltypen wurden mit speziell angepassten Medien kultiviert.

7.3.2 Bestimmung der Zelldichte

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer konnte die Menge der Zellen im Medium lichtmikroskopisch bestimmt werden. Dazu wurden die Zellsuspensionen vorverdünnt und 10 μ l in die Kammer pipettiert. Anschließend wurden 2-4 Großquadrate ausgezählt und die Zelldichte berechnet.

7.3.3 Kultivierung primärer Lymphozyten

Milz-Zellen wurden entweder direkt in Kulturmedium aufgenommen oder nach Aufreinigung der B-Zellen in Kultur genommen. In 96-Loch-Platten wurden je Loch 5×10^5 Zellen in 200 μ l B-Zell Medium mit 10 % (v/v) FKS kultiviert. Bei Stimulationsexperimenten wurden einige der Zellen mit agonistischen α -CD40-Antikörpern (2,5 μ g/ml; eBioscience (HM40-3)), α -IgM Antikörpern (15 μ g/mL; AffiniPure F(ab')₂ goat α -mouse IgM, μ -chain, Dianova), Interleukin 4 (IL-4; 1 ng/ml; rekombinant aus der Maus; Sigma), Lipopolysacchariden (LPS; 0,1 mg/mL; E.coli 055:B5, Sigma) oder Kombinationen dieser Stimulanzen, α -CD40 + IL4, kultiviert. Die Zellen wurden je nach Experiment bis zu fünf Tage in Kultur gehalten und zu verschiedenen Zeitpunkten deren Oberflächenmarker mit Antikörpern gefärbt. Der Prozentsatz lebender Zellen wurde wie in Abschnitt 7.1.10 mit TOPRO-3 durchgeführt und mittels FACSCalibur™ analysiert.

7.3.4 In vitro Proliferationsassay

Die Proliferationsrate von B-Zellen aus der Milz konnte durch die Markierung von isolierten B-Zellen (Abschnitt 7.1.3) mit 5-(und 6)-Carboxy-Fluoreszein-Diacetat Succinimidyl-Ester (CFSE, Molecular Probes) über mehrere Tage verfolgt werden. Bei CFSE handelt es sich um einen N-Succidimylester, der an Proteine der inneren Zellmembran bindet und dann zu einem fluoreszierenden Produkt umgesetzt wird. Bei der Zellteilung wird er gleichmäßig mit den Proteinen an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch diese dann nur noch halb so stark fluoreszieren wie die Mutterzelle (Quah et al., 2007). Für die Markierung mit CFSE wurden zunächst 5×10^5 Zellen pro Loch (96-Loch Platte) zweimal mit RPMI (ohne Zusätze) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 37°C warmen RPMI mit 5 μ M CFSE aufgenommen und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde das 5-fache Volumen von kaltem B-Zell Medium auf die Zellsuspension gegeben und diese anschließend für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen dann in B-Zell-Medium aufgenommen und, wie unter 7.2.3 beschrieben, mit verschiedenen Zusätzen kultiviert. In den darauffolgenden fünf Tagen wurde die Fluoreszenz und Anzahl der Zellen mittels FACSCalibur™ analysiert und mit FlowJo ausgewertet.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Agathangelou, A., G. Niedobitek, R. Chen, J. Nicholls, W. Yin, and L.S. Young. 1995. Expression of immune regulatory molecules in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas with prominent lymphoid stroma. Evidence for a functional interaction between epithelial tumor cells and infiltrating lymphoid cells. *The American journal of pathology* 147:1152-1160.
- Alcamo, E., N. Hacohen, L.C. Schulte, P.D. Rennert, R.O. Hynes, and D. Baltimore. 2002. Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *The Journal of experimental medicine* 195:233-244.
- Alcamo, E., J.P. Mizgerd, B.H. Horwitz, R. Bronson, A.A. Beg, M. Scott, C.M. Doerschuk, R.O. Hynes, and D. Baltimore. 2001. Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J Immunol* 167:1592-1600.
- Aldinucci, D., D. Poletto, P. Nanni, M. Degan, M. Rupolo, A. Pinto, and V. Gattei. 2002. CD40L induces proliferation, self-renewal, rescue from apoptosis, and production of cytokines by CD40-expressing AML blasts. *Experimental hematology* 30:1283-1292.
- Allman, D., R.C. Lindsley, W. DeMuth, K. Rudd, S.A. Shinton, and R.R. Hardy. 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* 167:6834-6840.
- Alt, F.W. 1984. Exclusive immunoglobulin genes. *Nature* 312:502-503.
- Altenburg, A., S.E. Baldus, H. Smola, H. Pfister, and S. Hess. 1999. CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma. *J Immunol* 162:4140-4147.
- Annunziata, C.M., R.E. Davis, Y. Demchenko, W. Bellamy, A. Gabrea, F. Zhan, G. Lenz, I. Hanamura, G. Wright, W. Xiao, S. Dave, E.M. Hurt, B. Tan, H. Zhao, O. Stephens, M. Santra, D.R. Williams, L. Dang, B. Barlogie, J.D. Shaughnessy, Jr., W.M. Kuehl, and L.M. Staudt. 2007. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer cell* 12:115-130.
- Arenzana-Seisdedos, F., P. Turpin, M. Rodriguez, D. Thomas, R.T. Hay, J.L. Virelizier, and C. Dargemont. 1997. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of cell science* 110 (Pt 3):369-378.
- Artis, D., C.M. Kane, J. Fiore, C. Zaph, S. Shapira, K. Joyce, A. Macdonald, C. Hunter, P. Scott, and E.J. Pearce. 2005. Dendritic cell-intrinsic expression of NF-kappa B1 is required to promote optimal Th2 cell differentiation. *J Immunol* 174:7154-7159.
- Balkhi, M.Y., J. Willette-Brown, F. Zhu, Z. Chen, S. Liu, D.C. Guttridge, M. Karin, and Y. Hu. 2012. IKKalpha-mediated signaling circuitry regulates early B lymphopoiesis during hematopoiesis. *Blood* 119:5467-5477.
- Bargou. 1997. Constitutive Nuclear Factor-kB-RelA Activation Is Required for Proliferation and Survival of Hodgkin's Disease Tumor Cells.
- Baumgarth, N. 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature reviews. Immunology* 11:34-46.
- Beinke, S., J. Deka, V. Lang, M.P. Belich, P.A. Walker, S. Howell, S.J. Smerdon, S.J. Gamblin, and S.C. Ley. 2003. NF-kappaB1 p105 negatively regulates TPL-2 MEK kinase activity. *Molecular and cellular biology* 23:4739-4752.
- Beinke, S., M.J. Robinson, M. Hugunin, and S.C. Ley. 2004. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. *Molecular and cellular biology* 24:9658-9667.

- Belich, M.P., A. Salmeron, L.H. Johnston, and S.C. Ley. 1999. TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-kappaB-inhibitory protein NF-kappaB1 p105. *Nature* 397:363-368.
- Benschop, R.J., and J.C. Cambier. 1999. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Current opinion in immunology* 11:143-151.
- Benson, R.J., B.S. Hostager, and G.A. Bishop. 2006. Rapid CD40-mediated rescue from CD95-induced apoptosis requires TNFR-associated factor-6 and PI3K. *European journal of immunology* 36:2535-2543.
- Bishop, G.A., C.R. Moore, P. Xie, L.L. Stunz, and Z.J. Kraus. 2007. TRAF proteins in CD40 signaling. *Advances in experimental medicine and biology* 597:131-151.
- Bosanac, I., I.E. Wertz, B. Pan, C. Yu, S. Kusam, C. Lam, L. Phu, Q. Phung, B. Maurer, D. Arnott, D.S. Kirkpatrick, V.M. Dixit, and S.G. Hymowitz. 2010. Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF-kappaB signaling. *Molecular cell* 40:548-557.
- Bourgeois, C., B. Rocha, and C. Tanchot. 2002. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297:2060-2063.
- Bowman, E.P., J.J. Campbell, D. Soler, Z. Dong, N. Manlongat, D. Picarella, R.R. Hardy, and E.C. Butcher. 2000. Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *The Journal of experimental medicine* 191:1303-1318.
- Brunet, J.F., F. Denizot, M.F. Luciani, M. Roux-Dosseto, M. Suzan, M.G. Mattei, and P. Golstein. 1987. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328:267-270.
- Burkly, L., C. Hession, L. Ogata, C. Reilly, L.A. Marconi, D. Olson, R. Tizard, R. Cate, and D. Lo. 1995. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373:531-536.
- Caamano, J.H., C.A. Rizzo, S.K. Durham, D.S. Barton, C. Raventos-Suarez, C.M. Snapper, and R. Bravo. 1998. Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *The Journal of experimental medicine* 187:185-196.
- Cariappa, A., H.C. Liou, B.H. Horwitz, and S. Pillai. 2000. Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 192:1175-1182.
- Chen, F., V. Castranova, and X. Shi. 2001. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *The American journal of pathology* 159:387-397.
- Chen, Z.J., V. Bhoj, and R.B. Seth. 2006. Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection? *Cell death and differentiation* 13:687-692.
- Choi, Y.S., R. Kageyama, D. Eto, T.C. Escobar, R.J. Johnston, L. Monticelli, C. Lao, and S. Crotty. 2011. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34:932-946.
- Chung, J.B., M. Silverman, and J.G. Monroe. 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in immunology* 24:343-349.
- Cinamon, G., M. Matloubian, M.J. Lesneski, Y. Xu, C. Low, T. Lu, R.L. Proia, and J.G. Cyster. 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nature immunology* 5:713-720.
- Corn, R.A., C. Hunter, H.C. Liou, U. Siebenlist, and M.R. Boothby. 2005. Opposing roles for RelB and Bcl-3 in regulation of T-box expressed in T cells, GATA-3, and Th effector differentiation. *J Immunol* 175:2102-2110.
- Cyster, J.G., K.M. Ansel, V.N. Ngo, D.C. Hargreaves, and T.T. Lu. 2002. Traffic patterns of B cells and plasma cells. *Advances in experimental medicine and biology* 512:35-41.
- Dallman, C., P.W. Johnson, and G. Packham. 2003. Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 8:45-53.
- Das, J., C.H. Chen, L. Yang, L. Cohn, P. Ray, and A. Ray. 2001. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nature immunology* 2:45-50.
- Das, S., J. Cho, I. Lambert, M.A. Kelliher, A.G. Eliopoulos, K. Du, and P.N. Tsichlis. 2005. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *The Journal of biological chemistry* 280:23748-23757.

- Davies, C.C., T.W. Mak, L.S. Young, and A.G. Eliopoulos. 2005. TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells. *Molecular and cellular biology* 25:9806-9819.
- Dechanet, J., C. Grosset, J.L. Taupin, P. Merville, J. Banchereau, J. Ripoche, and J.F. Moreau. 1997. CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J Immunol* 159:5640-5647.
- Dobrzanski, P., R.P. Ryseck, and R. Bravo. 1995. Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* 10:1003-1007.
- Edry, E., and D. Melamed. 2004. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol* 173:4265-4271.
- Eliopoulos, A.G., C.C. Wang, C.D. Dumitru, and P.N. Tsichlis. 2003. Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *The EMBO journal* 22:3855-3864.
- Ellinghaus, U., R.A. Rupec, O. Pabst, R. Ignatius, R. Forster, B. Dorken, and F. Jundt. 2008. IkappaBalpha is required for marginal zone B cell lineage development. *European journal of immunology* 38:2096-2105.
- Etzioni, A., and H.D. Ochs. 2004. The hyper IgM syndrome--an evolving story. *Pediatric research* 56:519-525.
- Faris, M., F. Gaskin, J.T. Parsons, and S.M. Fu. 1994. CD40 signaling pathway: anti-CD40 monoclonal antibody induces rapid dephosphorylation and phosphorylation of tyrosine-phosphorylated proteins including protein tyrosine kinase Lyn, Fyn, and Syk and the appearance of a 28-kD tyrosine phosphorylated protein. *The Journal of experimental medicine* 179:1923-1931.
- Feinman, R., D.S. Siegel, and J. Berenson. 2004. Regulation of NF-kB in multiple myeloma: therapeutic implications. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* 2:162-166.
- Fong, A., and S.C. Sun. 2002. Genetic evidence for the essential role of beta-transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF-kappa B2/p100. *The Journal of biological chemistry* 277:22111-22114.
- Forster, I., P. Vieira, and K. Rajewsky. 1989. Flow cytometric analysis of cell proliferation dynamics in the B cell compartment of the mouse. *International immunology* 1:321-331.
- Forster, R., I. Wolf, E. Kaiser, and M. Lipp. 1994. Selective expression of the murine homologue of the G-protein-coupled receptor BLR1 in B cell differentiation, B cell neoplasia and defined areas of the cerebellum. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40:381-387.
- Franzoso, G., L. Carlson, L. Poljak, E.W. Shores, S. Epstein, A. Leonardi, A. Grinberg, T. Tran, T. Scharton-Kersten, M. Anver, P. Love, K. Brown, and U. Siebenlist. 1998. Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *The Journal of experimental medicine* 187:147-159.
- Franzoso, G., L. Carlson, L. Xing, L. Poljak, E.W. Shores, K.D. Brown, A. Leonardi, T. Tran, B.F. Boyce, and U. Siebenlist. 1997. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes & development* 11:3482-3496.
- Gallagher, N.J., A.G. Eliopoulos, A. Agathangelo, J. Oates, J. Crocker, and L.S. Young. 2002. CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. *Molecular pathology : MP* 55:110-120.
- Gantke, T., S. Sriskantharajah, M. Sadowski, and S.C. Ley. 2012. IkappaB kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. *Immunological reviews* 246:168-182.
- Gareus, R., M. Huth, B. Breiden, A. Nenci, N. Rosch, I. Haase, W. Bloch, K. Sandhoff, and M. Pasparakis. 2007. Normal epidermal differentiation but impaired skin-barrier formation upon keratinocyte-restricted IKK1 ablation. *Nature cell biology* 9:461-469.
- Ghosh, S., and M.S. Hayden. 2008. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature reviews. Immunology* 8:837-848.
- Ghosh, S., and M. Karin. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.
- Gilfillan, S., A. Dierich, M. Lemeur, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261:1175-1178.

- Gires, O., U. Zimmer-Strobl, R. Gonnella, M. Ueffing, G. Marschall, R. Zeidler, D. Pich, and W. Hammerschmidt. 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *The EMBO journal* 16:6131-6140.
- Good-Jacobson, K.L., C.G. Szumilas, L. Chen, A.H. Sharpe, M.M. Tomayko, and M.J. Shlomchik. 2010. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature immunology* 11:535-542.
- Gray, D., K. Siepmann, D. van Essen, J. Poudrier, M. Wykes, S. Jainandunsing, S. Bergthorsdottir, and P. Dullforce. 1996. B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells. *Immunological reviews* 150:45-61.
- Grech, A.P., M. Amesbury, T. Chan, S. Gardam, A. Basten, and R. Brink. 2004. TRAF2 differentially regulates the canonical and noncanonical pathways of NF-kappaB activation in mature B cells. *Immunity* 21:629-642.
- Grumont, R.J., and S. Gerondakis. 1994. The subunit composition of NF-kappa B complexes changes during B-cell development. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 5:1321-1331.
- Grumont, R.J., I.J. Rourke, L.A. O'Reilly, A. Strasser, K. Miyake, W. Sha, and S. Gerondakis. 1998. B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *The Journal of experimental medicine* 187:663-674.
- Guerin, S., M.L. Baron, R. Valero, M. Herrant, P. Auberger, and P. Naquet. 2002. RelB reduces thymocyte apoptosis and regulates terminal thymocyte maturation. *European journal of immunology* 32:1-9.
- Guo, F., S. Tanzer, M. Busslinger, and F. Weih. 2008. Lack of nuclear factor-kappa B2/p100 causes a RelB-dependent block in early B lymphopoiesis. *Blood* 112:551-559.
- Guo, F., D. Weih, E. Meier, and F. Weih. 2007. Constitutive alternative NF-kappaB signaling promotes marginal zone B-cell development but disrupts the marginal sinus and induces HEV-like structures in the spleen. *Blood* 110:2381-2389.
- Hampel, F., S. Ehrenberg, C. Hojer, A. Draeseke, G. Marschall-Schroter, R. Kuhn, B. Mack, O. Gires, C.J. Vahl, M. Schmidt-Suprian, L.J. Strobl, and U. Zimmer-Strobl. 2011. CD19-independent instruction of murine marginal zone B-cell development by constitutive Notch2 signaling. *Blood* 118:6321-6331.
- Hams, E., M.J. McCarron, S. Amu, H. Yagita, M. Azuma, L. Chen, and P.G. Fallon. 2011. Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. *J Immunol* 186:5648-5655.
- Harnett, M.M. 2004. CD40: a growing cytoplasmic tale. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004:pe25.
- Hasbold, J., A.B. Lyons, M.R. Kehry, and P.D. Hodgkin. 1998. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *European journal of immunology* 28:1040-1051.
- Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* 18:2195-2224.
- Haynes, N.M., C.D. Allen, R. Lesley, K.M. Ansel, N. Killeen, and J.G. Cyster. 2007. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol* 179:5099-5108.
- He, J.Q., S.K. Saha, J.R. Kang, B. Zarnegar, and G. Cheng. 2007. Specificity of TRAF3 in its negative regulation of the noncanonical NF-kappa B pathway. *The Journal of biological chemistry* 282:3688-3694.
- Heissmeyer, V., D. Krappmann, E.N. Hatada, and C. Scheidereit. 2001. Shared pathways of IkappaB kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and IkappaBalpha. *Molecular and cellular biology* 21:1024-1035.
- Hoyer, C. 2009. Mechanisms of B cell activation and lymphomagenesis. LMU München.
- Homig-Holzel, C., C. Hojer, J. Rastelli, S. Casola, L.J. Strobl, W. Muller, L. Quintanilla-Martinez, A. Gewies, J. Ruland, K. Rajewsky, and U. Zimmer-Strobl. 2008. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *The Journal of experimental medicine* 205:1317-1329.

- Horwitz, B.H., P. Zelazowski, Y. Shen, K.M. Wolcott, M.L. Scott, D. Baltimore, and C.M. Snapper. 1999. The p65 subunit of NF-kappa B is redundant with p50 during B cell proliferative responses, and is required for germline CH transcription and class switching to IgG3. *J Immunol* 162:1941-1946.
- Hostager, B.S., S.A. Haxhinasto, S.L. Rowland, and G.A. Bishop. 2003. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)-deficient B lymphocytes reveal novel roles for TRAF2 in CD40 signaling. *The Journal of biological chemistry* 278:45382-45390.
- Hu, H., X. Wu, W. Jin, M. Chang, X. Cheng, and S.C. Sun. 2011. Noncanonical NF-kappaB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:12827-12832.
- Hu, Y., V. Baud, M. Delhase, P. Zhang, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, and M. Karin. 1999. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science* 284:316-320.
- Ishikawa, H., E. Claudio, D. Dambach, C. Raventos-Suarez, C. Ryan, and R. Bravo. 1998. Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50. *The Journal of experimental medicine* 187:985-996.
- Jabara, H.H., S.M. Fu, R.S. Geha, and D. Vercelli. 1990. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *The Journal of experimental medicine* 172:1861-1864.
- Janeway, C., K. Murphy, P. Travers, M. Walport. 2007. Janeway's immunobiologie. *Garaland Science, Taylor & Francies Group*, 7th edition.
- Kaisho, T., K. Takeda, T. Tsujimura, T. Kawai, F. Nomura, N. Terada, and S. Akira. 2001. IkappaB kinase alpha is essential for mature B cell development and function. *The Journal of experimental medicine* 193:417-426.
- Kanayama, A., R.B. Seth, L. Sun, C.K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y.H. Chiu, L. Deng, and Z.J. Chen. 2004. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Molecular cell* 15:535-548.
- Karin, M., and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual review of immunology* 18:621-663.
- Kato, K., M.J. Cantwell, S. Sharma, and T.J. Kipps. 1998. Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of clinical investigation* 101:1133-1141.
- Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto, and H. Kikutani. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167-178.
- Keats, J.J., R. Fonseca, M. Chesi, R. Schop, A. Baker, W.J. Chng, S. Van Wier, R. Tiedemann, C.X. Shi, M. Sebag, E. Braggio, T. Henry, Y.X. Zhu, H. Fogle, T. Price-Troska, G. Ahmann, C. Mancini, L.A. Brents, S. Kumar, P. Greipp, A. Dispenzieri, B. Bryant, G. Mulligan, L. Bruhn, M. Barrett, R. Valdez, J. Trent, A.K. Stewart, J. Carpten, and P.L. Bergsagel. 2007. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer cell* 12:131-144.
- Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology* 26:677-704.
- Kerfoot, S.M., G. Yaari, J.R. Patel, K.L. Johnson, D.G. Gonzalez, S.H. Kleinstein, and A.M. Haberman. 2011. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34:947-960.
- Kim, S., R.N. La Motte-Mohs, D. Rudolph, J.C. Zuniga-Pflucker, and T.W. Mak. 2003. The role of nuclear factor-kappaB essential modulator (NEMO) in B cell development and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1203-1208.
- Kitano, M., S. Moriyama, Y. Ando, M. Hikida, Y. Mori, T. Kurosaki, and T. Okada. 2011. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34:961-972.

- Kraus, M., M.B. Alimzhanov, N. Rajewsky, and K. Rajewsky. 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 117:787-800.
- Krummel, M.F., and J.P. Allison. 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *The Journal of experimental medicine* 183:2533-2540.
- Kulwichit, W., R.H. Edwards, E.M. Davenport, J.F. Baskar, V. Godfrey, and N. Raab-Traub. 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:11963-11968.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laird, P.W., A. Zijderveld, K. Linders, M.A. Rudnicki, R. Jaenisch, and A. Berns. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic acids research* 19:4293.
- Lam, K.P., R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1997. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90:1073-1083.
- Lamothe, B., W.K. Webster, A. Gopinathan, A. Besse, A.D. Campos, and B.G. Darnay. 2007. TRAF6 ubiquitin ligase is essential for RANKL signaling and osteoclast differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 359:1044-1049.
- Lee, S.K., R.J. Rigby, D. Zotos, L.M. Tsai, S. Kawamoto, J.L. Marshall, R.R. Ramiscal, T.D. Chan, D. Gatto, R. Brink, D. Yu, S. Fagarasan, D.M. Tarlinton, A.F. Cunningham, and C.G. Vinuesa. 2011. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *The Journal of experimental medicine* 208:1377-1388.
- Lee, S.Y., A. Reichlin, A. Santana, K.A. Sokol, M.C. Nussenzweig, and Y. Choi. 1997. TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 7:703-713.
- Li, Z.W., W. Chu, Y. Hu, M. Delhase, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, and M. Karin. 1999. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 189:1839-1845.
- Li, Z.W., S.A. Omori, T. Labuda, M. Karin, and R.C. Rickert. 2003. IKK beta is required for peripheral B cell survival and proliferation. *J Immunol* 170:4630-4637.
- Lin, L., G.N. DeMartino, and W.C. Greene. 1998. Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell* 92:819-828.
- Lin, L., and S. Ghosh. 1996. A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Molecular and cellular biology* 16:2248-2254.
- Liou, H.C., G.P. Nolan, S. Ghosh, T. Fujita, and D. Baltimore. 1992. The NF-kappa B p50 precursor, p105, contains an internal I kappa B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *The EMBO journal* 11:3003-3009.
- Liou, H.C., W.C. Sha, M.L. Scott, and D. Baltimore. 1994. Sequential induction of NF-kappa B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation. *Molecular and cellular biology* 14:5349-5359.
- Liu, Y.J., O. de Bouteiller, and I. Fugier-Vivier. 1997. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Current opinion in immunology* 9:256-262.
- Maier, H.J., R. Marienfeld, T. Wirth, and B. Baumann. 2003. Critical role of RelB serine 368 for dimerization and p100 stabilization. *The Journal of biological chemistry* 278:39242-39250.
- Mak, T.W., A. Shahinian, S.K. Yoshinaga, A. Wakeham, L.M. Boucher, M. Pintlilie, G. Duncan, B.U. Gajewska, M. Gronski, U. Eriksson, B. Odermatt, A. Ho, D. Bouchard, J.S. Whorisky, M. Jordana, P.S. Ohashi, T. Pawson, F. Bladt, and A. Tafuri. 2003. Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nature immunology* 4:765-772.
- Martin, F., and J.F. Kearney. 2001. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current opinion in immunology* 13:195-201.

- Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney. 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14:617-629.
- McHeyzer-Williams, M.G., and R. Ahmed. 1999. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Current opinion in immunology* 11:172-179.
- Melchers, F., H. Karasuyama, D. Haasner, S. Bauer, A. Kudo, N. Sakaguchi, B. Jameson, and A. Rolink. 1993. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunology today* 14:60-68.
- Meng, F., L. Liu, P.C. Chin, and S.R. D'Mello. 2002. Akt is a downstream target of NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry* 277:29674-29680.
- Mercurio, F., J.A. DiDonato, C. Rosette, and M. Karin. 1993. p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction. *Genes & development* 7:705-718.
- Moore, C.R., Y. Liu, C. Shao, L.R. Covey, H.C. Morse, 3rd, and P. Xie. 2012. Specific deletion of TRAF3 in B lymphocytes leads to B-lymphoma development in mice. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 26:1122-1127.
- Moore, P.A., O. Belvedere, A. Orr, K. Pieri, D.W. LaFleur, P. Feng, D. Soppet, M. Charters, R. Gentz, D. Parmelee, Y. Li, O. Galperina, J. Giri, V. Roschke, B. Nardelli, J. Carrell, S. Sosnovtseva, W. Greenfield, S.M. Ruben, H.S. Olsen, J. Fikes, and D.M. Hilbert. 1999. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 285:260-263.
- Moorthy, A.K., O.V. Savinova, J.Q. Ho, V.Y. Wang, D. Vu, and G. Ghosh. 2006. The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *The EMBO journal* 25:1945-1956.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102:553-563.
- Nie, Y., J. Waite, F. Brewer, M.J. Sunshine, D.R. Littman, and Y.R. Zou. 2004. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *The Journal of experimental medicine* 200:1145-1156.
- Nishimura, H., N. Minato, T. Nakano, and T. Honjo. 1998. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *International immunology* 10:1563-1572.
- Nishimura, H., T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Nakatani, M. Hara, A. Matsumori, S. Sasayama, A. Mizoguchi, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291:319-322.
- Nurieva, R.I., Y. Chung, G.J. Martinez, X.O. Yang, S. Tanaka, T.D. Matskevitch, Y.H. Wang, and C. Dong. 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325:1001-1005.
- Oeckinghaus, A., and S. Ghosh. 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a000034.
- Okada, T., V.N. Ngo, E.H. Ekland, R. Forster, M. Lipp, D.R. Littman, and J.G. Cyster. 2002. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *The Journal of experimental medicine* 196:65-75.
- Parry, R.V., C.A. Rumbley, L.H. Vandenberghe, C.H. June, and J.L. Riley. 2003. CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 171:166-174.
- Pasparakis, M., M. Schmidt-Suppran, and K. Rajewsky. 2002. IkappaB kinase signaling is essential for maintenance of mature B cells. *The Journal of experimental medicine* 196:743-752.
- Pellat-Deceunynck, C., M. Amiot, N. Robillard, J. Wijdenes, and R. Bataille. 1996. CD11a-CD18 and CD102 interactions mediate human myeloma cell growth arrest induced by CD40 stimulation. *Cancer research* 56:1909-1916.
- Pohl, T., R. Gugasyan, R.J. Grumont, A. Strasser, D. Metcalf, D. Tarlinton, W. Sha, D. Baltimore, and S. Gerondakis. 2002. The combined absence of NF-kappa B1 and c-Rel reveals that

- overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:4514-4519.
- Pullen, S.S., T.T. Dang, J.J. Crute, and M.R. Kehry. 1999. CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *The Journal of biological chemistry* 274:14246-14254.
- Pullen, S.S., H.G. Miller, D.S. Everdeen, T.T. Dang, J.J. Crute, and M.R. Kehry. 1998. CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* 37:11836-11845.
- Quah, B.J., H.S. Warren, and C.R. Parish. 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature protocols* 2:2049-2056.
- Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381:751-758.
- Reif, K., E.H. Ekland, L. Ohl, H. Nakano, M. Lipp, R. Forster, and J.G. Cyster. 2002. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416:94-99.
- Ren, C.L., S.M. Fu, and R.S. Geha. 1994. Protein tyrosine kinase activation and protein kinase C translocation are functional components of CD40 signal transduction in resting human B cells. *Immunological investigations* 23:437-448.
- Revy, P., T. Muto, Y. Levy, F. Geissmann, A. Plebani, O. Sanal, N. Catalan, M. Forveille, R. Dufourcq-Labeau, A. Gennery, I. Tezcan, F. Ersoy, H. Kayserili, A.G. Ugazio, N. Brousse, M. Muramatsu, L.D. Notarangelo, K. Kinoshita, T. Honjo, A. Fischer, and A. Durandy. 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102:565-575.
- Rickert, R.C., J. Roes, and K. Rajewsky. 1997. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic acids research* 25:1317-1318.
- Rose, M.L., M.S. Birbeck, V.J. Wallis, J.A. Forrester, and A.J. Davies. 1980. Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature* 284:364-366.
- Rose, M.L., and F. Malchiodi. 1981. Binding of peanut lectin to thymic cortex and germinal centres of lymphoid tissue. *Immunology* 42:583-591.
- Rossi, D., V. Trifonov, M. Fangazio, A. Bruscaggini, S. Rasi, V. Spina, S. Monti, T. Vaisitti, F. Arruga, R. Fama, C. Ciardullo, M. Greco, S. Cresta, D. Piranda, A. Holmes, G. Fabbri, M. Messina, A. Rinaldi, J. Wang, C. Agostinelli, P.P. Piccaluga, M. Lucioni, F. Tabbo, R. Serra, S. Franceschetti, C. Deambrogi, G. Daniele, V. Gattei, R. Marasca, F. Facchetti, L. Arcaini, G. Inghirami, F. Bertoni, S.A. Pileri, S. Deaglio, R. Foa, R. Dalla-Favera, L. Pasqualucci, R. Rabadan, and G. Gaidano. 2012. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *The Journal of experimental medicine* 209:1537-1551.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Saito, K., J. Sakurai, J. Ohata, T. Kohsaka, H. Hashimoto, K. Okumura, R. Abe, and M. Azuma. 1998. Involvement of CD40 ligand-CD40 and CTLA4-B7 pathways in murine acute graft-versus-host disease induced by allogeneic T cells lacking CD28. *J Immunol* 160:4225-4231.
- Sambrook, J., and D.W. Russell. 2006. Agarose gel electrophoresis. *CSH protocols* 2006:
- Sasaki, Y., E. Derudder, E. Hobeika, R. Pelanda, M. Reth, K. Rajewsky, and M. Schmidt-Supprian. 2006. Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. *Immunity* 24:729-739.

- Schmidl, S. 2010. The role of AID and NF- κ B for B cell development and lymphomagenesis. TU München.
- Schmidt-Supprian, M., G. Courtois, J. Tian, A.J. Coyle, A. Israel, K. Rajewsky, and M. Pasparakis. 2003. Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity* 19:377-389.
- Schmidt-Supprian, M., J. Tian, H. Ji, C. Terhorst, A.K. Bhan, E.P. Grant, M. Pasparakis, S. Casola, A.J. Coyle, and K. Rajewsky. 2004. I kappa B kinase 2 deficiency in T cells leads to defects in priming, B cell help, germinal center reactions, and homeostatic expansion. *J Immunol* 173:1612-1619.
- Sen, R., and D. Baltimore. 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921-928.
- Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F.R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S.C. Sun, and M. Karin. 2001. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293:1495-1499.
- Sha, W.C., H.C. Liou, E.I. Tuomanen, and D. Baltimore. 1995. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80:321-330.
- Snapper, C.M., P. Zelazowski, F.R. Rosas, M.R. Kehry, M. Tian, D. Baltimore, and W.C. Sha. 1996. B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. *J Immunol* 156:183-191.
- Solan, N.J., H. Miyoshi, E.M. Carmona, G.D. Bren, and C.V. Paya. 2002. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *The Journal of biological chemistry* 277:1405-1418.
- Speirs, K., L. Lieberman, J. Caamano, C.A. Hunter, and P. Scott. 2004. Cutting edge: NF-kappa B2 is a negative regulator of dendritic cell function. *J Immunol* 172:752-756.
- Tafuri, A., A. Shahinian, F. Bladt, S.K. Yoshinaga, M. Jordana, A. Wakeham, L.M. Boucher, D. Bouchard, V.S. Chan, G. Duncan, B. Odermatt, A. Ho, A. Itie, T. Horan, J.S. Whoriskey, T. Pawson, J.M. Penninger, P.S. Ohashi, and T.W. Mak. 2001. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 409:105-109.
- Takeda, K., O. Takeuchi, T. Tsujimura, S. Itami, O. Adachi, T. Kawai, H. Sanjo, K. Yoshikawa, N. Terada, and S. Akira. 1999. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* 284:313-316.
- Tarakhovsky, A. 1997. Bar Mitzvah for B-1 cells: how will they grow up? *The Journal of experimental medicine* 185:981-984.
- Teoh, G., Y.T. Tai, M. Urashima, S. Shirahama, M. Matsuzaki, D. Chauhan, S.P. Treon, N. Raje, T. Hideshima, Y. Shima, and K.C. Anderson. 2000. CD40 activation mediates p53-dependent cell cycle regulation in human multiple myeloma cell lines. *Blood* 95:1039-1046.
- Thompson, C.B., and J.P. Allison. 1997. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7:445-450.
- Tomayko, M.M., S.M. Anderson, C.E. Brayton, S. Sadanand, N.C. Steinell, T.W. Behrens, and M.J. Shlomchik. 2008. Systematic comparison of gene expression between murine memory and naive B cells demonstrates that memory B cells have unique signaling capabilities. *J Immunol* 181:27-38.
- Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581.
- Towbin, A. 1970. Central nervous system damage in the human fetus and newborn infant. Mechanical and hypoxic injury incurred in the fetal-neonatal period. *Am J Dis Child* 119:529-542.
- Vallabhapurapu, S., and M. Karin. 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* 27:693-733.
- van Kooten, C., and J. Banchereau. 1997. Functional role of CD40 and its ligand. *International archives of allergy and immunology* 113:393-399.
- Walunas, T.L., C.Y. Bakker, and J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *The Journal of experimental medicine* 183:2541-2550.

- Walunas, T.L., D.J. Lenschow, C.Y. Bakker, P.S. Linsley, G.J. Freeman, J.M. Green, C.B. Thompson, and J.A. Bluestone. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413.
- Wang, C., L. Deng, M. Hong, G.R. Akkaraju, J. Inoue, and Z.J. Chen. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351.
- Wang, J., I.M. Okazaki, T. Yoshida, S. Chikuma, Y. Kato, F. Nakaki, H. Hiai, T. Honjo, and T. Okazaki. 2010. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *International immunology* 22:443-452.
- Wang, J., T. Yoshida, F. Nakaki, H. Hiai, T. Okazaki, and T. Honjo. 2005. Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11823-11828.
- Waterfield, M., W. Jin, W. Reiley, M. Zhang, and S.C. Sun. 2004. IkappaB kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 24:6040-6048.
- Waterfield, M.R., M. Zhang, L.P. Norman, and S.C. Sun. 2003. NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Molecular cell* 11:685-694.
- Weih, D.S., Z.B. Yilmaz, and F. Weih. 2001. Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *J Immunol* 167:1909-1919.
- Weih, F., D. Carrasco, S.K. Durham, D.S. Barton, C.A. Rizzo, R.P. Ryseck, S.A. Lira, and R. Bravo. 1995. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* 80:331-340.
- Weih, F., G. Warr, H. Yang, and R. Bravo. 1997. Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *J Immunol* 158:5211-5218.
- Wolniak, K.L., S.M. Shinall, and T.J. Waldschmidt. 2004. The germinal center response. *Critical reviews in immunology* 24:39-65.
- Xiao, G., E.W. Harhaj, and S.C. Sun. 2001. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Molecular cell* 7:401-409.
- Xie, P., L.L. Stunz, K.D. Larison, B. Yang, and G.A. Bishop. 2007. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs. *Immunity* 27:253-267.
- Xu, J., T.M. Foy, J.D. Laman, E.A. Elliott, J.J. Dunn, T.J. Waldschmidt, J. Elsemore, R.J. Noelle, and R.A. Flavell. 1994. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1:423-431.
- Yamazaki, T., H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D.M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma, and H. Yagita. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169:5538-5545.
- Yang, H.T., S. Papoutsopoulou, M. Belich, C. Brender, J. Janzen, T. Gantke, M. Handley, and S.C. Ley. 2012. Coordinate regulation of TPL-2 and NF-kappaB signaling in macrophages by NF-kappaB1 p105. *Molecular and cellular biology* 32:3438-3451.
- Yilmaz, Z.B., D.S. Weih, V. Sivakumar, and F. Weih. 2003. RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *The EMBO journal* 22:121-130.
- Yusuf, I., R. Kageyama, L. Monticelli, R.J. Johnston, D. Ditoro, K. Hansen, B. Barnett, and S. Crotty. 2010. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* 185:190-202.
- Zarnegar, B., J.Q. He, G. Oganessian, A. Hoffmann, D. Baltimore, and G. Cheng. 2004. Unique CD40-mediated biological program in B cell activation requires both type 1 and type 2 NF-kappaB activation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8108-8113.
- Zhang, J., C.C. Chang, L. Lombardi, and R. Dalla-Favera. 1994. Rearranged NFkB2 gene in the HUT78 T-lymphoma cell line codes for a constitutively nuclear factor lacking transcriptional repressor functions. *Oncogene* 9:1931-1937.
- Zhang, J., M.A. Warren, S.F. Shoemaker, and M.M. Ip. 2007. NFkappaB1/p50 is not required for tumor necrosis factor-stimulated growth of primary mammary epithelial cells: implications for NFkappaB2/p52 and RelB. *Endocrinology* 148:268-278.

- Zhong, X., J.R. Tumang, W. Gao, C. Bai, and T.L. Rothstein. 2007. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *European journal of immunology* 37:2405-2410.
- Zimber-Strobl, U., B. Kempkes, G. Marschall, R. Zeidler, C. Van Kooten, J. Banchereau, G.W. Bornkamm, and W. Hammerschmidt. 1996. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *The EMBO journal* 15:7070-7078.

Erklärung

Diese Dissertation wurde von Oktober 2008 bis Dezember 2012 am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik (später Abteilung für Genvektoren) des Helmholtz Zentrums München in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl erstellt und von Prof. Dr. Dirk Eick betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Kristina Stojanovic (geb. Djermanovic), geboren am 09. Juni 1982 in München, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Sämtliche Experimente wurden von mir selbst durchgeführt, sofern nicht explizit auf Dritte verwiesen wird. Diese Dissertation hat weder in gleicher oder ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe weder bereits früher Doktorgrade erworben noch versucht zu erwerben.

München, Juli 2013

Kristina Stojanovic

DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl, die es mir ermöglicht hat an diesem tollen Projekt zu arbeiten. Vielen Dank für die großartige Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft und auch humorvollen Gespräche. Vielen Dank auch dafür, dass ich die Freiheit hatte eigenständige Ideen zu entwickeln.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dick Eick für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Ich möchte mich ebenfalls bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kolleginnen bedanken: Sabine Schmidl für die tolle Zusammenarbeit und ihre kontinuierliche Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Franziska Jagdhuber dafür, dass sie mich sehr gut eingelernt hat und immer für mich da war.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Labormädels für die freundschaftliche Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima bedanken. Viele Ideen wären ohne Euch nicht entstanden: Petra Fiedler, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mich zu jeder Zeit unterstützt hat. Samantha Feicht für die sehr lustige Zeit als Labor-Nachbarin, ihr offenes Ohr bei vielen Fragen und die spanische Geheimsprache. Anne Draeseke für das viele laute Lachen, das meinen Laboralltag fröhlicher gestaltet hat. Stefanie Ehrenberg für viele tiefgründige Gespräche und die vielen „Schenkelklopfer“. Anna Pollithy für die vielen neuen technischen Methoden und den neuen Einblick in die Kaffeewelt.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Gabriele Marschall-Schröter bedanken, die mich mit ihrer hilfsbereiten Art bei den Immunisierungs-Experimenten immer tatkräftig unterstützte.

Vielen Dank Lothar Strobl für die vielen fruchtbaren Diskussionen und die Hilfsbereitschaft bei der Literaturrecherche.

Ein besonderer Dank gilt den Mitgliedern des Tierstalls am Biozentrum (Manfred, Andy, Undine und Bianca). Vielen Dank für die sehr gute Betreuung meiner Mäuse und eure Unterstützung bei der Organentnahme.

Ich danke meinem Mann Aleksandar, der mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt hat. Daher ist diese Arbeit vor allem ihnen gewidmet.